Die Steuerung des Protein-turnover bei *Acetabularia mediterranea* im Rot- und Blaulicht am Beispiel der UDPG-Pyrophosphorylase (Uridin-5'-triphosphat: α-D-Glucose-1-phosphat-Uridylyltransferase, EC 2.7.7.9.)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt dem
Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin

von Bernhard Eugen Nickl
aus Berlin

1985

Die Steuerung des Protein-turnover bei *Acetabularia mediterranea* im Rot- und Blaulicht am Beispiel der UDPG-Pyrophosphorylase (Uridin-5`-triphosphat: α-D-Glucose-1-phosphat-Uridylyltransferase, EC 2.7.7.9.)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt dem
Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin

von
Bernhard Eugen Nickl
aus Berlin

1985

1. Referent: Prof. Dr. C. Schnarrenberger
2. Referent: Prof. Dr. K. Graszynski

Tag der mündlichen Prüfung: 2.5.1985

Herrn Prof. Dr. H. CLAUSS gewidmet, der in zahlreichen Diskussionen die Grundlage für diese Arbeit schuf.

Abkürzungen

DTE	Dithioerythrit
G-1.6-bP	Glucose-1.6-bisphosphat
HO PR	Hydroxypyruvat-Reductase
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduziert)
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NaPPi	Natriumpyrophosphat
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UDPG	Uridin-5`-diphosphat-Glucose
Upm	Umdrehungen pro Minute

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549615_0041

Enzymnomenklatur

ß-Galactosidase	EC 3.2.1.23
Hydroxypyruvat-Reductase	EC 1.1.1.81
Uridin-diphosphat-Glucose-Pyrophosphorylase = Uridin-5`-triphosphat:α-D-Glucose-1-phosphat-Uridylyltransferase	EC 2.7.7.9

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I	Einleitung	1
II	Material und Methoden	8
1.	Material	8
1.1.	Kulturen	8
1.2.	Standardrotlicht- und Standardblaulicht-feld	8
1.3.	Verwendete Chemikalien	9
2.	Methoden	10
2.1.	Gewinnung der Enzymrohextrakte	10
2.2.	Bestimmung der Enzymaktivitäten	10
2.2.1.	UDPG-Pyrophosphorylase	11
2.2.2.	Hydroxypyruvat-Reductase	11
2.2.3.	β-Galactosidase	12
2.3.	Proteinbestimmung	12
2.4.	Versuchswerte	12
2.5.	Dichtemarkierung	13
2.6.	Herstellung des Dichtegradienten	13
2.7.	Isopyknische Zentrifugation	14
2.8.	Methoden zur mathematischen Auswertung	15
2.8.1.	Trennung der Enzymaktivitätsprofile nach der Dichtegradientenzentrifugation in markierte und unmarkierte Anteile	15
2.8.2.	Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten für den Enzymabbau (kd)	16
2.8.3.	Erstellung von Faktorfunktionen der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten	17
2.8.4.	Computergestützte Berechnungen von Enzymgehalten auf der Basis der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten	18
2.8.5.	Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten für den Enzymzuwachs (ks0-Werte) zu	

		Seite
	Versuchsbeginn (Tag0)	20
2.8.6.	Bestimmung der markierten Brutto-Enzymmenge	20
2.8.7.	Computersimulierte Enzymzuwachsraten während Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung	23
2.8.8.	Computersimulierte Enzymzuwachsraten im Dauerrot- und Dauerblaulicht	24
III	Ergebnisse	25
1.	UDPG-Pyrophosphorylase	25
1.1.	Beeinflussung der Enzymaktivität durch Blaulicht	25
1.1.1.	Verhalten der Enzymaktivität nach kurzen Blaulichtpulsen	25
1.2.	Untersuchungen zum Mechanismus der Enzymkontrolle	30
1.2.1.	Unabhängigkeit der Aktivitätsänderungen vom Zellkern	30
1.2.2.	Mischung von Extrakten aus Rot- und Blaulichtzellen	30
1.2.3.	Der Einfluß von Translationsinhibitoren auf den blaulichtinduzierten Aktivitätsanstieg des Enzyms	33
1.2.3.1.	Cycloheximid	33
1.2.3.2.	Chloramphenicol	33
2.	Hydroxypyruvat-Reductase	38
2.1.	Die Aktivität der Hydroxypyruvat-Reductase im Rot- und Blaulicht	38
2.2.	Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Blaulichtfluenz	42
3.	Dichtemarkierung	42
3.1.	Dichtemarkierung während dreitägiger Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung	42
3.1.1.	Ganze Zellen	42

		Seite
3.1.2.	Kernlose Zellteilstücke	43
3.2.	Dichtemarkierung bei Induktion durch Blaulichtpuls	43
3.3.	Bestimmung des Enzymabbaus im Rot- und Blaulicht	50
3.4.	Ergebnisse aus der Dichtemarkierung unter Berücksichtigung des Enzymabbaus	57
4.	Modellrechnungen auf der Grundlage der vorliegenden experimentellen Ergebnisse	58
4.1.	Computergestützte Berechnungen der Gehalte an UDPG-Pyrophosphorylase und Hydroxypyruvat-Reductase auf der Basis der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten während unterschiedlicher Lichtbedingungen	58
4.1.1.	Dauerrot- und Dauerblaulicht	58
4.1.2.	Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung	63
4.1.3.	Blaulichtpuls kurzer Dauer	63
4.2.	Computersimulierte Zuwachsraten der UDPG-Pyrophosphorylase und der Hydroxypyruvat-Reductase während Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung	65
4.3.	Computersimulierte Zuwachsraten der UDPG-Pyrophosphorylase und der Hydroxypyruvat-Reductase im Dauerrot- und Dauerblaulicht	65
IV	Diskussion	70
V	Zusammenfassung	82
VI	Literatur	84

I Einleitung

Acetabularia mediterranea (=A. acetabulum (L.) SILVA) ist eine siphonale Grünalge (Dasycladales, Chlorophyceae). Ihre vegetative Entwicklung beginnt durch polares Auswachsen der Zygote, wobei sich ein zylindrischer Stiel bildet. Dieser wächst hauptsächlich durch apikales Wachstum. In regelmäßiger Folge entstehen dabei seitlich abstehende Haarwirtel. Am Ende der vegetativen Entwicklungsphase wird der artspezifische Hut (Gametangienträger) gebildet. Am unteren Ende des Stiels befindet sich eine Haftdifferenzierung, das den einzigen Zellkern enthaltende Rhizoid.

Eine Reihe von Eigenschaften machen Acetabularia mediterranea seit den Untersuchungen von HÄMMERLING (1931) für bestimmte morphogenetische und physiologische Fragestellungen besonders geeignet. So lassen sich durch Abtrennung des Rhizoids leicht kernlose Systeme herstellen, die einige Wochen lebensfähig sind. Dabei wird auch in diesen kernlosen Teilstücken die Morphogenese über längere Zeit fortgesetzt, d.h. es können sich Wirtel und schließlich ein Hut ausbilden (HÄMMERLING, 1932, 1934; HÄMMERLING et al., 1958). Daß die morphogenetischen Leistungen dennoch von der vorherigen Anwesenheit des Zellkerns abhängig sind, läßt sich durch Transplantationsexperimente belegen. Acetabularia ist dadurch ein Standardobjekt für Kern-Cytoplasma-Interaktionen geworden (Zusammenfassungen bei: BRACHET und LANG, 1963 ; HÄMMERLING, 1963; KECK, 1964; BRACHET, 1967; SCHWEIGER, 1969, 1976, 1982; SCHWEIGER et al., 1975; BRACHET und BONOTTO, 1970; PUISEUX - DAO, 1970; WERZ, 1974; SCHWEIGER und BERGER, 1979,1981; KLOPPSTECH und SCHWEIGER, 1982).
Die gute Regenerationsfähigkeit kernloser Zellteilstücke machen Acetabularia mediterranea auch zu einem passenden Modellsystem, an dem eine posttranskriptionale Kontrolle der Morphogenese auf einfache und überzeugende Weise nachgewiesen werden kann. In der Hauptsache wurde hier eine post-

transkriptionale Kontrolle in Verbindung mit Vorgängen bei der Hutbildung untersucht:
In den hauptsächlich aus Mannose und Galactose aufgebauten Zellwänden (IRIKI und MIWA, 1960; MIWA et al., 1961; WERZ, 1963) ist der Anteil an Glucose und Galactose in der Zellwand des Hutes weitaus größer als in der Zellwand des Stiels (WERZ, 1963, 1970; ZETSCHE, 1967).
Dieser Befund führte zu einer genaueren Untersuchung der Enzyme des Galactosestoffwechsels. Sämtliche Enzyme, die für die Synthese von Uridindiphosphatgalactose aus Fructose-6-phosphat erforderlich sind, konnten in Acetabularia mediterranea nachgewiesen werden (ZETSCHE, 1965a, 1966a). Es wurde dabei festgestellt, daß einige dieser Enzyme mit Beginn der Hutbildung einen starken Anstieg ihrer spezifischen Aktivität aufwiesen. Es sind dies die Phosphoglucomutase (GRIENINGER und ZETSCHE, 1972), die UDPG-4-Epimerase (ZETSCHE, 1966b) und die UDPG-Pyrophosphorylase (ZETSCHE, 1968; ZETSCHE et al., 1970).
Darüber hinaus wurde festgestellt, daß dieser Anstieg der spezifischen Enzymaktivität auch dann eintrat, wenn den Zellen kurz zuvor entweder der Kern entfernt wurde, oder sie mit dem Transkriptionshemmstoff Actinomycin D behandelt wurden.
(Dagegen konnten in einem anderen Labor die Ergebnisse für die UDPG-Pyrophosphorylase nicht bestätigt werden. Nach diesen Untersuchungen war die Aktivität des Enzyms auch während der Hutbildung mit dem Gesamtproteingehalt der Zelle korreliert (DILLARD et al., 1983).)

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen zwar dafür, daß morphogenetische Ereignisse (z.B. die Hutbildung) mit spezifischen Veränderungen in der Enzymausstattung gekoppelt sind, die Untersuchungen sind allerdings nicht weitergeführt worden. Dies liegt nicht zuletzt daran, daß der Nachweis von Regulationsmechanismen ein hohes Maß an Synchronität der zugrunde liegenden Vorgänge in den Einzelindividuen erfor-

dert. Das ist jedoch beim Übergang zur Hutbildung nicht voll gewährleistet. Die Synchronisierung z.B. der Wirtelbildung ist hingegen möglich: Die Morphogenese der Hut- und Wirtelbildung von Acetabularia bedarf der Anwesenheit von blauem Licht (CLAUSS, 1963, 1968; SCHMID, 1984). Im Rotlicht schwächt sich die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen stark ab. In der Regel werden keine Haarwirtel oder Hüte gebildet. Durch eine anschließende Bestrahlung mit Blaulicht kann eine sofortige Wiederaufnahme des Wachstums, d.h. ein charakteristisches Auswachsen der Zellspitze, Wirtelbildung und später die Anlage eines Hutes initiiert werden (CLAUSS, 1963, 1968, 1973; IDZIAK, 1980). Dabei ist dann zumindest über etwa 24 h ein hohes Maß an Synchronität dieser Vorgänge in den einzelnen Zellen zu beobachten.

Solche Einflüsse der Lichtqualität betreffen jedoch nicht nur die äußere Morphogenese, sondern vor allem auch den Stoffwechsel. So nimmt beim Übergang vom Rot- ins Blaulicht der Einbau von photosynthetisch fixiertem CO_2 in Saccharose innerhalb von drei Tagen um das ca. 8fache zu (CLAUSS, 1972). Dies steht möglicherweise im Zusammenhang mit entsprechenden Änderungen der spezifischen Aktivität der UDPG-Pyrophosphorylase, einem Enzym des Saccharosesyntheseweges (NICKL, 1979):

Bei Blaulichtbestrahlung steigt die Aktivität dieses Enzyms mit dem Wachstum der Zelle an, im Rotlicht bleibt sie jedoch auf einem niedrigen Niveau und nimmt über Wochen ab. Wird nach 3 Wochen Rotlicht mit Dauerblaulicht bestrahlt, so steigt die Enzymaktivität steil auf das etwa 3-4fache an (Abb. 1). Dieser Vorgang wird als Blaulichtaktivierung des Enzyms bezeichnet. Die auf Protein bezogene spezifische Aktivität des Enzyms bleibt im Blaulicht zunächst konstant und nimmt dann stetig zu. Im Rotlicht sinkt sie zuerst stark, dann langsamer und kontinuierlich über Wochen ab. Wird nach längerer Rotlichtbestrahlung mit Blaulicht akti-

— S.7

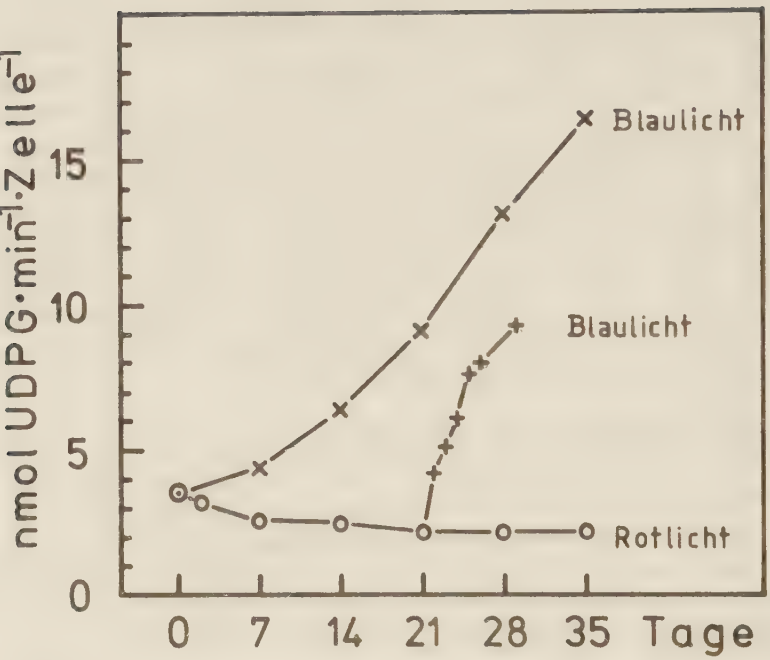

Abb. 1
Aktivität der UDPG-Pyrophosphorylase im Rot- und Blaulicht, sowie während Blaulichtbestrahlung nach 21 Tagen Rotlicht.

Zellen von Acetabularia mediterranea im Stadium kurz vor der Hutbildung wurden auf 5 mm zurückgeschnitten und nach einer zweitägigen Erholungsphase im Weißlicht ins Rot- oder Blaulicht gebracht.
Ein Teil der Zellen wurde nach 21 Tagen Rotlicht ins Blaulicht übertragen.
(nach NICKL, 1979)

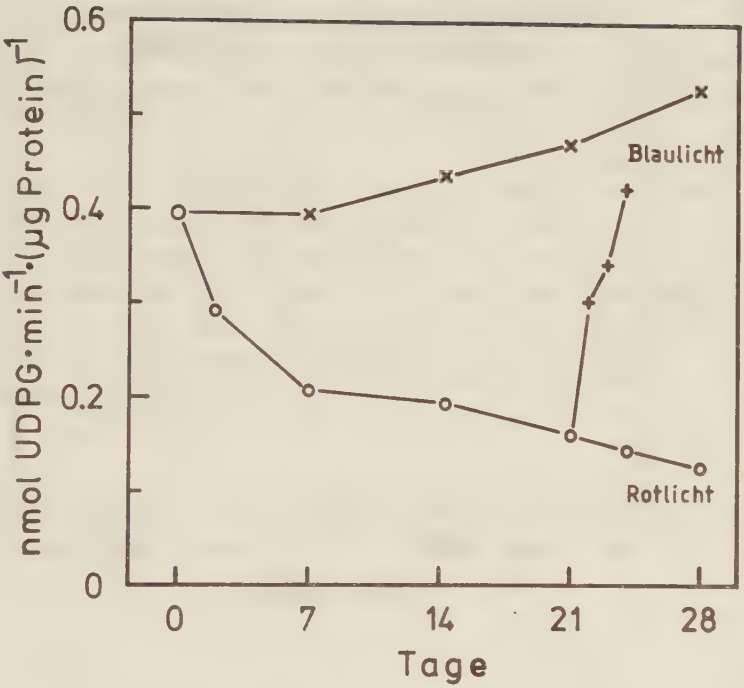

Abb. 2
Spezifische Aktivität der UDPG-Pyrophosphorylase im Rot- und Blaulicht, sowie während Blaulichtbestrahlung nach 21tägiger Rotlichtvorbehandlung.
Experimentelle Angaben siehe Abbildung 1.
(nach NICKL, 1979)

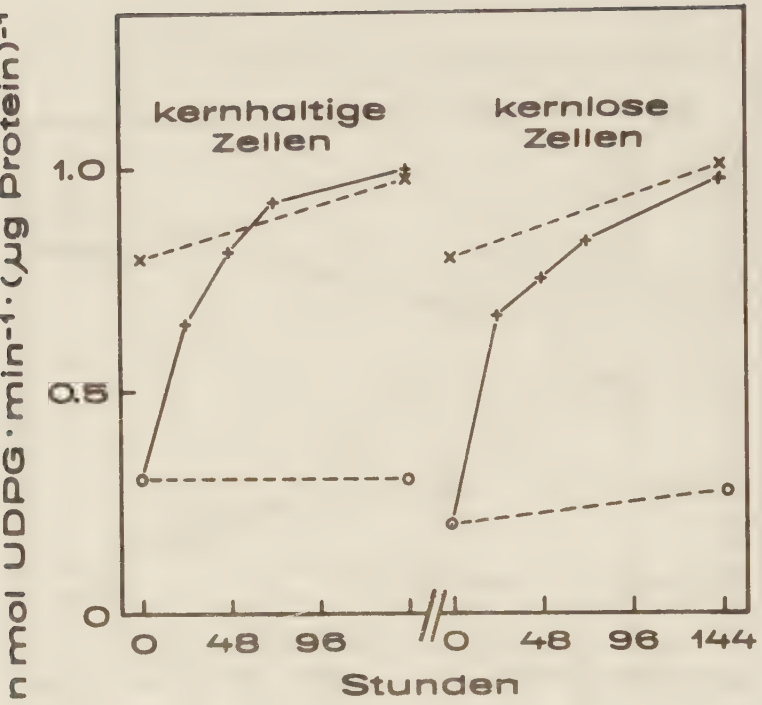

Abb. 3
Verhalten der spezifischen Aktivität der UDPG-Pyrophosphorylase von kernlosen und kernhaltigen Acetabularien während Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung.
Zellen von Acetabularia mediterranea wurden 21 Tage mit Rotlicht bestrahlt und dann ins Blaulicht übertragen (+ - +).
Ein Teil der Zellen blieb zur Kontrolle im Rotlicht (o - o), ein anderer befand sich seit Versuchsbeginn im Dauerblaulicht (X - X). Das Entfernen der Kerne geschah durch Resektion der Rhizoide vor der Blaulichtbestrahlung.
(nach NICKL, 1979)

viert, steigt die spezifische Aktivität innerhalb von ca. 3 Tagen um das etwa 2,5 bis 3,5fache der Rotlichtkontrolle in den Bereich der Dauerblaulicht-Werte an (Abb. 2).
Auch kernlose Zellteilstücke weisen den gleichen starken Anstieg der spezifischen Aktivität auf (Abb. 3).
Aus dem letzten Befund wird deutlich, daß der Aktivitätsanstieg des Enzyms nicht eine Frage der Transkriptionskontrolle ist.

Mit der vorliegenden Arbeit soll der Versuch unternommen werden, den Fragen nach der Art der Enzymkontrolle nachzugehen. Experimente mit Hemmstoffen der Proteinbiosynthese sollen über den Ort, an dem der Steuerungsmechanismus einsetzt, Aufschluß geben, Markierungsversuche mit deuterierten Aminosäuren Aussagen über Synthese, Gehalt und Abbau des Enzyms ermöglichen.

II Material und Methoden

1. Material

1.1. Kulturen

Die Versuche wurden mit Nachzuchten von Acetabularia mediterranea aus dem hiesigen Institut durchgeführt (interne Nomenklatur: RA 11, 5II M1 und Nachzucht KOOP). Die Algen wurden unter standardisierten Bedingungen angezogen (HÄMMERLING, 1963). Als Kulturmedium wurde Erd-Schreiber-Lösung (BETH, 1953) oder später synthetisches Nährmedium (SCHWEIGER et al., 1977) verwendet.
Als Lichtquelle dienten weiße Leuchtstoffröhren (65 W/15 Osram, Berlin). Die Lichtintensität wurde raumintegrierend gemessen und lag bei etwa 4000-5000 Lux. Die Licht- und Dunkelphasen wechselten in einem 10:14 h Rhythmus. Die Temperatur in den Kulturräumen betrug 21 ±1°C.
Für die Versuche wurden die noch hutlosen Algen zwei Tage vor der Bestrahlung mit monochromatischem Licht auf 5 mm (bzw. 10 mm) Stiellänge zurückgeschnitten. Kernlose Acetabularien wurden durch Abtrennung des Rhizoids hergestellt.

Acetabularien, die zu Beginn der Versuche 3 Wochen im Standardrotlicht gehalten wurden, werden im weiteren Text als mit Rotlicht vorbehandelt bezeichnet.

1.2. Standardrotlicht- und Standardblaulichtfeld

Das Standardrotlichtfeld (MOHR et al., 1964) wurde durch rote Leuchtstoffröhren (TL/15, Deutsche Philips, Hamburg) erzeugt. Vor den Leuchtstoffröhren befand sich ein Farbfilter aus 3 mm dickem, rotem Plexiglas (Nr.501, Röhm GmbH, Darmstadt). Durch das Filter gelangte Licht zwischen den Wellenlängen 580 und 700 nm. Das Emissionsmaximum lag bei

660 nm.
Für das Standardblaulichtfeld (CLAUSS, 1972) wurden blaue Leuchtstoffröhren (TL/03, Deutsche Philips, Hamburg) verwendet. Um ausschließlich Licht der Wellenlängen zwischen 350 und 500 nm zu erhalten wurde vor die Leuchtstoffröhren ein Filter aus 2 mm dickem, blauem Signalglas (Sonderschmelze von Schott & Gen., Mainz) gesetzt. Das Emissionsmaximum dieser Versuchsanordnung lag bei 410nm (SCHMID und CLAUSS, 1974). Ein geringer Dunkelrotanteil gelangte ebenfalls durch das Filter, da eine Filterung durch Kupfersulfatlösung unterblieb. Der Blaulichteffekt wird durch den Dunkelrotanteil nicht beeinflußt (CLAUSS, 1972).
Rot- und Blaulicht wurden auf gleiche Quantenstromdichte eingestellt ($1{,}6*10^5$ mol Photonen * m^{-2} * s^{-1}).
Die Strahlungsintensität wurde mit der Thermosäule (AEG) gemessen. Die Streulichtkorrektur erfolgte mit dem Luxmeter nach GAASTRA (1959).

1.3. Verwendete Chemikalien

BOEHRINGER, Mannheim:	NADP, Dinatriumsalz
	NADH, Dinatriumsalz, Grad II
	Phosphoglucomutase
	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
	Uridin-5`-diphosphoglucose, Dinatriumsalz
	β-Galactosidase
	4-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
	Cycloheximid
3M COMPANY, Kamen	Fluorinert FC 48 (1,93 g * cm^{-2} (+25°C))
MERCK, Darmstadt	Rubidiumchlorid
	Deuteriumoxid

MERCK, SCHARP & DOHME, Montreal, Canada	deuterierte Aminosäuren aus Algen
SIGMA CHEMIE GmbH, München	α-D-Glucose-1.6-bisphosphat β-Hydroxypyruvat Dithioerythrit (DTE) Trishydroxymethylaminomethan (Tris)
BIO RAD,München	Protein-Assay zur Proteinbestimmung nach BRADFORD

2. Methoden

2.1. Gewinnung der Enzymrohextrakte

Die Algen wurden vor ihrer Aufarbeitung zweimal in bidest. Wasser gewaschen und mit Filterpapier abgetupft.
Zur Bestimmung der UDPG-Pyrophosphorylase- und der Hydroxypyruvat-Reductase-Aktivität wurden je 50 Algen in 2 ml Pufferlösung mit Hilfe von Glashomogenisatoren (POTTER-ELVEHJEM Typ) aufgeschlossen. Der Homogenisationspuffer (pH 7,4) hatte folgende Zusammensetzung:

Na_2HPO_4/NaH_2PO_4	0,2 mol/l
$MgCl_2$	5 mmol/l
DTE	5 mmol/l

Das Homogenat wurde in einer Kühlzentrifuge (Modell Beckmann J21 B) bei 30 000 g zentrifugiert.
Der Überstand wurde als Enzymrohextrakt im Eisbad aufbewahrt.
Die in den vorliegenden Versuchen gemessenen Enzymaktivitäten wurden aus diesem Rohextrakt bestimmt. Eine Modifikation der Gewinnung dieses Rohextraktes erfolgte bei den Dichtemarkierungsexperimenten und wird dort beschrieben.

2.2. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Aktivitäten der UDPG-Pyrophosphorylase und der Hydroxypyruvat-Reductase wurden nach der Methode des zusammengesetzten bzw. einfachen optischen Tests bestimmt (BÜCHER et al., 1964). Die Geschwindigkeit der $NADP^+$ -Reduktion (UDPG-Pyrophosphorylase) und der NADH-Oxidation (Hydroxypyruvat-Reductase) wurde mit dem ZEISS-Spektralphotometer DM 4 bei 340 nm gemessen. Die Messung sowohl der UDPG-Pyrophosphorylase als auch der Hydroxypyruvat-Reductase erfolgte bei 30 °C. Eine mögliche geringe NADH-Oxidase-Aktivität wurde durch einen Kontrollansatz ohne Startreagenz im eingesetzten Zweistrahlspektralphotometer kompensiert.

2.2.1. UDPG-Pyrophosphorylase

Zusammensetzung des Assays (modifiziert nach MUNCH-PETERSEN, 1955):

184 mmol/l Tris/HCl, pH 7,4
6,9 mmol/l MgCl
3 mmol/l DTE
438 µmol/l NADP
3,29 µmol/l G-1.6-bP
1,065 mmol/l UDPG
1,5 mmol/l NaPPi
0,444 Units/ml Phosphoglucomutase
1,556 Units/ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Pro 1 ml Assay wurden 20 µl Enzymrohextrakt oder nach der Dichtegradientenzentrifugation 50 µl der Gradientenlösung hinzugegeben. Die Reaktion wurde mit Natriumpyrophosphatlösung gestartet.

2.2.2. Hydroxypyruvat-Reductase

Die Aktivität der Hydroxypyruvat-Reductase wurde in einem modifizierten Assay nach TOLBERT et al. (1970) bestimmt.

160 mmol/l Phosphatpuffer, pH 6,4

0,2 mmol/l NADH
1,164 mmol/l Hydroxypyruvat
50 µl Enzymextrakt bzw. Gradienten-Lsg. wurden zum Assay gegeben. Die Reaktion wurde mit Hydroxypyruvat gestartet.

2.2.3. β-Galactosidase

Als externes Markerenzym für die Dichtegradientenzentrifugation wurde die β-Galactosidase eingesetzt. Die Bestimmung der ß-Galactosidase-Aktivität erfolgte nach WALLENFELS et al. (1959). Das Reaktionsvolumen betrug 0,55 ml; das Assay enthielt:

91 mmol/l Tris/Acetat ,pH 7,1
0,905 mmol/l O-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid

50 µl Enzymlösung wurden zum Start der Reaktion zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die Temperatur war konstant 37°C. Die Reaktion wurde durch 0,5 ml 1mol/l Na_2CO_3 gestoppt.
Die Messung erfolgte bei 410 nm im Spektralphotometer gegen einen Testansatz ohne β-Galactosidase-Aktivität.

2.3. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte in der Regel aus dem noch nicht zentrifugierten Homogenat. Der TCA-fällbare Anteil wurde mehrfach mit Methanol gewaschen und der Proteinstickstoff nach der Micro-Kjeldahl-Methode (CLEGHORN und JENDRASSIK, 1934) bestimmt.
In einigen Versuchen wurde der Gehalt an im Rohextrakt gelösten Proteinen nach der Methode von BRADFORD (1976) ermittelt. Hierzu wurde ein aliquot aus dem zentrifugierten Rohextrakt entnommen. Nach SCHMID und CLAUSS (1975) sind lösliche und unlösliche Proteinanteile unter allen Lichtbedingungen linear korreliert.

2.4. Versuchswerte

Sowohl bei den Enzymmessungen als auch bei der Proteinbestimmung wurden jeweils zwei unabhängige Parallelen angesetzt. Die Meßwerte in den Graphiken stellen die Mittelwerte dar.

2.5. Dichtemarkierung

Das Prinzip der Dichtemarkierung von Proteinen ist der Einbau von letztlich dichtemarkierten Aminosäuren in das de novo synthetisierte Protein (HU et al., 1962; HÜTTERMANN und WENDELBERGER, 1976; JOHNSON, 1977). Daran schließt sich die Trennung der markierten und unmarkierten Proteinmoleküle in einem Dichtegradienten an. In den beschriebenen Versuchen erfolgte die Dichtemarkierung in kleinen Petrischalen, wobei je 50 Acetabularien in 10 ml Inkubationslösung (10 mg ^{2}H-Aminosäuren /1 ml Kulturmedium) gegeben wurden.

Die Kulturen von Acetabularia mediterranea wachsen nicht axenisch. Der Zusatz von deuterierten Aminosäuren zum Kulturmedium macht es notwendig, mit geeigneten Mitteln Bakterien- und Pilzwachstum zu verhindern. Experimente mit Penicillin, Ampicillin, Streptomycin und Chloramphenicol zeigten, daß nur die Zugabe von mindestens 5 µg/ml Chloramphenicol das Bakterien- und Pilzwachstum während der Markierungsphase verhindert.
Der Aktivitätsanstieg der UDPG-Pyrophosphorylase während Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung wird jedoch auch durch die Zugabe der 10fachen Konzentration an Chloramphenicol nicht verändert (Abb. 9).

2.6. Herstellung des Dichtegradienten

Die $RbCl/D_2O$ Gradienten zur Trennung dichtemarkierter und unmarkierter Proteine wurden nach einer leicht veränderten Methode von WENDELBERGER-SCHIEWEG (1977) und FLEMMING (1979)

hergestellt. Je 50 Algen wurden in 3 ml Pufferlösung homogenisiert. Die Pufferlösung bestand aus Deuteriumoxid (D_2O) und 1 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,2 im Volumenverhältnis von 19:1.
Zum Schutz von SH-Gruppen befanden sich im Homogenisationspuffer 5 mmol/l Dithioerythrit (DTE). Die Herstellung des Enzymrohextrakts erfolgte wie bereits beschrieben. Dem Rohextrakt wurde Rubidiumchlorid (RbCl) bis zu einer Endkonzentration von 20,7% (w/w) zugegeben. Als externer Dichtemarker kamen noch 0,3 Units β-Galactosidase hinzu. In einem Polyallomerröhrchen (SORVALL, DU PONT) wurde ein zweischichtiger RbCl/D_2O-Gradient hergestellt: 3 ml des Rohextrakts (20,7% (w/w) RbCl) wurden 4 ml RbCl/D_2O-Lösung (25,4% (w/w) RbCl) überschichtet. Dieser Zweistufengradient lag auf einem Kissen aus 1 ml Fluorinert. Das Polyallomerröhrchen wurde über dem Zweistufengradienten mit flüssigem Paraffin aufgefüllt.

2.7. Isopyknische Zentrifugation

Zentrifugiert wurden die Gradienten 65 Stunden in einem Festwinkelrotor (TFT 65.13, SORVALL, DU PONT) bei 65 000 Upm (Röhrchenmitte ca. 285 000 g) in der Ultrazentrifuge (OTD 75, SORVALL, DU PONT). Nach der Zentrifugation wurde der Gradient fraktioniert. Je 4 Tropfen ergaben eine Fraktion. Bei jeder 10. Fraktion wurde der Brechungsindex mit einem ABBE-Refraktometer (ZEISS) bestimmt. Auf die Dichte wurde mit Hilfe einer Eichkurve umgerechnet.
Zu den anderen Fraktionen wurden jeweils 150 µl Phosphatpuffer (0,2 mol/l, pH 7,4) und 5 mmol/l DTE gegeben. Je 50 µl dieser Lösung wurden zur Aktivitätsbestimmung der Enzyme entnommen.

2.8. Methoden zur mathematischen Auswertung

2.8.1. Trennung der Enzymaktivitätsprofile nach der Dichtegradientenzentrifugation in markierte und unmarkierte Anteile

Die Trennung der Aktivitätsprofile nach isopyknischer Zentrifugation in dichtemarkierte und unmarkierte Anteile erfolgte durch nichtlineare Regression unter Berücksichtigung der least square Methode. Hierfür und für die weiteren Berechnungen wurde ein PC Sharp MZ-731 mit eingebautem Plotter eingesetzt.
Pro Aktivitätsprofil wurde von zwei GAUSS`schen Verteilungen ausgegangen (Abb. 13-16b; HU et al., 1962; HÜTTERMANN und WENDELBERGER, 1976).
Jedoch zeigte das Aktivitätsprofil im Bereich geringer Dichte (unmarkierter Enzymanteil) eine ausgeprägte Schiefe. Daher mußte die darunterliegende GAUSS`sche Verteilung so modifiziert werden, daß sich der Sigma-Wert der Halbwertsbreite in funktionaler Abhängigkeit von der Dichte stetig änderte. Dadurch wurde diese Verteilung asymmetrisch. Außerdem standen die beiden Verteilungen in einem Ähnlichkeitsverhältnis zueinander, d.h. Höhe und Halbwertsbreite wurden in wechselseitiger Abhängigkeit entwickelt. Diese Restriktion mußte entsprechend den physikalischen Bedingungen im Dichtegradienten gemacht werden (HU et al., 1962; WENDELBERGER-SCHIEWEG, 1977).
Nach der Bestimmung der Parameter für die Verteilungen konnten die entsprechenden Flächen unterhalb der Kurven durch ein numerisches Integrationsverfahren berechnet werden. Dadurch ließen sich die markierten und unmarkierten Aktivitätsanteile der Enzyme trennen.

2.8.2. Berechnungen der Geschwindigkeitskonstanten für den Enzymabbau (kd)

Da die Aktivitätswerte für den Abbau der UDPG-Pyrophosphorylase und der Hydroxypyruvat-Reductase in halblogarithmischer Auftragung annähernd auf einer Geraden lagen, konnten Regressionsgraden gezogen werden (Abb. 17). Dies führte zu der Annahme einer Abbaukinetik 1.Ordnung, was für eine große Zahl anderer Enzyme ebenfalls zutrifft (PRICE und STEVENS, 1982).
Denn es gilt, mit E(t)= Enzymaktivität zur Zeit t:

$$dE(t)/dt = -kd*E(t)$$

$$\ln E(t) = -\int kd*dt$$

$$\ln E(t) = -kd*t+\ln E0 \qquad (Gl.1)$$

Die halblogarithmische Auftragung von Gleichung 1 ergibt eine Gerade (y = - ax + b).
Nach Auflösung der Gleichung 1 erhält man:

$$E(t) = E0*\exp(-kd*t) \qquad (Gl.2)$$

Aus Gleichung 2 kann jetzt der kd-Wert für die Halbwertszeit bestimmt werden:

$$E0/(2*E0) = \exp(-kd*t1/2)$$

$$kd = \ln 2/t1/2$$

Für die Berechnungen in dieser Arbeit wurden die kd-Werte zusätzlich numerisch über die least square Methode ermittelt (nichtlineare Regression).

2.8.3. Erstellung von Faktorfunktionen der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten

Ausgangspunkt waren vorliegende Meßergebnisse der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten/Zelle von Acetabularia mediterranea im Dauerrotlicht, Dauerblaulicht sowie während Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung und nach einem 2minütigem Blaulichtpuls. Im Blaulicht erhöhen sich die Proteinsyntheseraten innerhalb von 5 Wochen auf das ca. 4fache. Im Rotlicht sinken sie innerhalb dieses Zeitraumes auf etwa 80% des Anfangswertes linear ab. Wird nach 3 Wochen Rotlicht mit Blaulicht bestrahlt, steigen die Proteinsyntheseraten in 5 Tagen um das 3 bis 4fache an. Werden die Zellen dagegen nach 3 Wochen Rotlichtbestrahlung einem nur zweiminütigen Blaulichtpuls ausgesetzt, steigen die durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten innerhalb von 3 Tagen auf das etwa 3fache an und sinken nach 3 weiteren Tagen wieder auf die Werte der Rotlichtkontrolle ab (SCHMID, unveröffentlicht).
Aus der graphischen Darstellung der Meßpunkte wurden stetige, empirische Faktorfunktionen angesetzt, deren Parameter C1, C2 und C3 über die least square-Methode ermittelt wurden.

Dauerrotlicht (Abb.22): $f1(t) = 1 - C1*t$ (Gl.3)

Dauerblaulicht (Abb.22): $f2(t) = C1*(1- \exp(-C2*t))+1$ (Gl.4)

Blaulicht nach Rotlichtvorbehandlung (Abb.21):

$$f3(t) = C1*(1 - \exp(-C2*t))+1 \qquad (Gl.4`)$$

2minütiger Blaulichtpuls:

$$f4(t) = C1 * t * \exp(-C2*t) + \cos(C3*t) \qquad (Gl.5)$$

2.8.4. Computergestützte Berechnungen von Enzymgehalten auf der Basis der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten

Es kann vorausgesetzt werden, daß die Enzymsynthese allgemein einer Kinetik 0.Ordnung folgt (PRICE und STEVENS, 1982). Für die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme wird eine Zerfallskinetik 1.Ordnung angenommen (Abb.17; Gleichung 2). Hieraus ergibt sich für die zeitliche Änderung der Enzymaktivität folgende Differentialgleichung:

$$dE(t)/dt = ks0 - kd*E(t) \qquad (Gl.6)$$

Um die Syntheserate des jeweiligen Enzyms an die zeitliche Änderung der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten anzupassen, muß die Geschwindigkeitskonstante der Enzymsynthese (ks0) mit einer sich zeitlich verändernden Funktion (fi(t)) multipliziert werden. Die Funktion fi(t) ist eine der oben beschriebenen Faktorfunktionen der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten. Somit erhält man eine modifizierte Darstellung der Gleichung 6:

$$dE(t)/dt = ks0*fi(t) - kd*E(t) \qquad (Gl.7)$$

Lösen der Differentialgleichung 7 ergibt

$$E(t) = \exp(-kd*t) * ks0 * \int fi(t) * \exp(kd*t)*dt + C * \exp(-kd*t) \qquad (Gl.7`)$$

Die spezielle Betrachtung des Integrals aus Gleichung 7`

$$\int fi(t)*\exp(kd*t)*dt \qquad \text{mit } i = 1,\ldots,4$$

für die verschiedenen Faktorfunktionen der Proteinsyntheseraten und die Bestimmung der Integrationskonstanten C durch

die Anfangsbedingung (E(t=0)≡E0) führt schließlich zu den nachfolgenden theoretischen Enzymaktivitätsfunktionen.

Dauerrotlicht:

$$E(t) = ks0/kd*(1 - C1*t + C1/kd) + \exp(-kd*t) * (E0 - ks0/kd*(1 + C1/kd)) \quad (Gl.8)$$

Dauerblaulicht:

$$E(t) = ks0*((C1 + 1)/kd - C1/(kd - C2)*\exp(-C2*t)) + \exp(- kd*t)*(E0 - ks0*((C1 + 1)/kd - C1/(kd - C2))) \quad (Gl.9)$$

Blaulicht nach 21 Tagen Rotlicht mit ks21 = ks`0

$$E(t) = ks`0*((C1+1)/kd-C1/(kd-C2)*\exp(-C2*t)) + \exp(-kd*t)*(E0-ks`0*((C1+1)/kd-C1/(kd-C2))) \quad (Gl.9`)$$

2minütiger Blaulichtpuls nach Rotlichtvorbehandlung mit ks21 = ks`0:

$$E(t) = ks`0*((\exp(-C2*t)*C1*((kd-C2)*t-1))/(kd-C2)^2 + (kd * \cos(C3*t) + C3*\sin(C3*t))/(kd*kd+C3*C3)) + \exp(-kd*t)*(E0-ks`0*(kd/(kd*kd+C3*C3)-C1/(kd-C2)^2)) \quad (GL.10)$$

2.8.5. Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten für den Enzymzuwachs (ks0-Werte) zu Versuchsbeginn (Tag 0)

Die Anfangsgeschwindigkeitskonstanten (ks0) der Funktionen 8 und 9 wurden im Computer über die least square Methode ermittelt, wobei die C1- und C2-Werte aus den entsprechenden Funktionen 3 und 4 übernommen wurden: Die ks0-Werte wurden so lange variiert, bis die Summe der Differenzenquadrate zwischen den berechneten Funktionswerten und den experimentell bestimmten Meßdaten der Enzymaktivitäten ein Minimum ergaben.

2.8.6. Bestimmung der markierten Brutto-Enzymmenge

Es ist von Interesse, jeweils die Gesamtmenge an markiertem Emzym nach dreitägiger Dichtemarkierung während Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung mit derjenigen der entspechenden Rotlichtkontrolle zu vergleichen. Da aber während dieser Zeit auch der markierte Enzymanteil einem Abbau (turnover) unterliegt, muß dies bei der Berechnung der Gesamt- (= Brutto-) Markierung berücksichtigt werden.
Für die Berechnung der Gesamtmarkierung der UDPG-Pyrophosphorylase wurde ein konstanter ks-Wert für die Geschwindigkeitskonstante der Synthese angenommen. Dieser ergab sich aus dem Verlauf der rückgerechneten Syntheseraten (Abb. 21). Die Bruttomarkierung des Enzyms kann dann auf folgende Weise berechnet werden, mit

AMn(t) = markierter Anteil des Aktivitätsprofils, berechnet aus den Dichtemarkierungsexperimenten. Dieser entspricht der Netto-Markierung mit Berücksichtigung des Abbaus und

AMb(t) = theoretisch zu erwartender, markierter Anteil an der Gesamtaktivität. Dieser entspricht dann der Brutto-Markierung ohne Berücksichtigung des Abbaus

$$dAMn(t)/dt = ks - AMn(t)*kd \qquad \text{(Gl. 11)}$$

Durch Lösen dieser Differentialgleichung erhält man

$$AMn(t) = (\exp(-kd*t) * (ks*kd*AMn0)-ks) * (-1/kd) \qquad \text{(Gl. 11`)}$$

mit AMn0 = 0 (Anfangsbedingung) und Umstellen der Gleichung 11` wird

$$ks = kd * AMn(t) / (1 - \exp(- kd*t)) \qquad \text{(Gl. 12)}$$

Um die Brutto-Markierung des Enzyms zu erfassen wird in Gleichung 11 der Abbauterm gleich 0 gesetzt.
Man erhält dann

$$dAMb(t) / dt = ks \qquad \text{(Gl. 13)}$$

$$AMb(t) = \int_0^t ks*dt$$

$$AMb(t) = ks * t \qquad \text{(Gl.13`)}$$

Einsetzen von Gleichung 12 in Gleichung 13` ergibt

$$AMb(t) = t * kd * AMn(t) / (1-\exp(-kd*t)) \qquad \text{(Gl.14)}$$

Wird in Gleichung 14 t = 3 gesetzt, ergibt sich die Brutto-Markierung der UDPG-Pyrophosphorylase während dreitägiger Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung.

Die Hydroxypyruvat-Reductase zeigt dagegen während dieser Blaulichtbestrahlung einen ansteigenden ks-Wert, der dem Verlauf der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten folgt (Abb.21). Die Brutto-Markierung dieses Enzyms muß daher folgendermaßen ermittelt werden:

$$dAMn(t) / dt = ks * f(t) - kd * AMn(t) \qquad (Gl.15)$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung erfolgt analog der Differentialgleichung 7

$$f(t) = C1 * (1-exp(-C2*t)) + 1$$

Mit AMn0 = 0 (Anfangsbedingung) und Umstellen nach ks, ergibt sich:

$$ks = AMn(t) / ((C1+1) * (1-exp(-kd*t)) / kd + C1$$

$$* (exp(-kd*t) - exp(-C2*t)) / (kd-C2)) \qquad (Gl.16)$$

Setzt man den Abbauterm in Gleichung 15 Null, läßt sich die Brutto-Markierung des Enzyms ermitteln:

$$dAMb(t) / dt = ks * f(t) \qquad (Gl.17)$$

$$AMb(t) = ks * \int_0^t (C1 * (1- exp(- C2 * t)) + 1)\, dt$$

$$AMb(t) = ks * (C1*t + C1/C2 * (exp(-C2*t)-1) + t) \qquad (Gl.17`)$$

Für die Berechnung der Brutto-Markierung wurde schließlich ks in Gleichung 17` durch die rechte Seite von Gleichung 16 ersetzt.

Im Rotlicht folgen die Aktivitäten beider Enzyme dem Verlauf der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten (Abb. 18, 19 und 22).
Die Brutto-Markierung kann jeweils analog zu der Hydroxypyruvat-Reductase während Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung berechnet werden, da von einem nicht konstanten (sinkendem) ks-Wert ausgegangen werden muß.

$$dAMn(t) / dt = ks * f(t) - kd * AMn(t) \qquad (Gl.18)$$

mit $f(t) = 1 - C1 * t$

ergibt nach Auflösung der Differentialgleichung, mit AMn0 = 0 und Umstellen nach ks:

$$ks = AMn(t) * kd / (1-C1 * t + C1/kd - \exp(-kd*t) - \exp(-kd*t) * C1/kd) \qquad (Gl.19)$$

Der Abbauterm in Gleichung 18 wird Null gesetzt, um die Brutto-Markierung zu erhalten:

$$dAMb(t) / dt = ks * f(t) \qquad (Gl.20)$$

$$AMb(t) = ks * \int_0^t (1 - C1*t)\, dt$$

$$AMb(t) = ks * (t-C1*t^2 / 2) \qquad (Gl.20`)$$

Wird jetzt ks in Gleichung 20` durch die rechte Seite von Gleichung 19 ersetzt, läßt sich die Brutto-Markierung der UDPG-Pyrophosphorylase und der Hydroxypyruvat-Reductase im Rotlicht berechnen.

2.8.7. Computersimulierte Enzymzuwachsraten während Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung

Die Zuwachsraten wurden nach dem gleichen Rechenverfahren wie die ks0-Werte ermittelt. Die in der Funktion 9` auftretenden Parameter C1 und C2 waren aber frei wählbar. Anschließend wurden die berechneten Werte für C1 und C2 in die entsprechende Syntheseratenfaktorfunktion f3(t) eingesetzt. Auf diese Weise konnten aus den jeweils gemessenen

Enzymaktivitäten die dazugehörenden Zuwachsraten der UDPG-Pyrophosphorylase und der Hydroxypyruvat-Reductase zurückgerechnet werden.

2.8.8. Computersimulierte Enzymzuwachsraten im Dauerrot- und Dauerblaulicht

Wie für die Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeitskonstanten (ksO) wurden die Funktionsgleichungen 8 und 9 verwendet, die Parameter C1 und C2 waren aber auch in diesem Fall für den Computer frei wählbar.
Zur numerischen Ermittlung der Parameter C1 und C2 sowie zur Bestimmung von ksO wurde die least square Methode benutzt. Bis auf den kd-Wert, er wurde in den Dichtemarkierungsexperimenten bestimmt, waren somit sämtliche Parameter frei wählbar.
Die so gewonnenen Parameter wurden anschließend in die entsprechenden Syntheseratenfaktorfunktionen f1(t) bzw. f2(t) eingesetzt.

III Ergebnisse

1. UDPG-Pyrophosphorylase

1.1. Beeinflussung der Enzymaktivität durch Blaulicht

Bereits aus früheren Befunden (NICKL, 1979) ist klar, daß die Aktivität der UDPG-Pyrophosphorylase nach einer längeren Rotlichtvorbehandlung durch Blaulicht spezifisch gesteigert werden kann (Abb. 1 und 2). Diese Aktivitätssteigerung war bei Dauerblaulicht beobachtet worden. In den folgenden Experimenten wurde der Einfluß von kurzen Blaulichtpulsen untersucht.

1.1.1. Verhalten der Enzymaktivität nach kurzen Blaulichtpulsen

Der Anstieg der UDPG-Pyrophosphorylase-Aktivität nach einer Rotlichtvorbehandlung läßt sich auch durch einen einfachen Blaulichtpuls induzieren (Abb. 4a). Unter diesen Umständen erreicht die Enzymaktivität nach 3 Tagen ein Maximum, um aber dann im Gegensatz zu einer Dauerblaulichtbestrahlung wieder abzusinken. Dabei ist allerdings die Geschwindigkeit der Zunahme geringer als die bei der Dauerblaulichtkontrolle. Ein entsprechendes Ergebnis erhält man auch, wenn man die Aktivität auf den Proteingehalt der Zellen bezieht (Abb. 4b).
Für eine quantitative Auswertung der Abhängigkeit des Anstiegs der UDPG-Pyrophosphorylase-Aktivität von der Blaulichtmenge wurde im weiteren die Fluenz des induzierenden Blaulichts variiert.
Zellen von Acetabularia mediterranea wurden drei Wochen mit Rotlicht bestrahlt und erhielten anschließend Blaulichtpulse unterschiedlicher Dauer. Nach weiteren drei Tagen Rot-

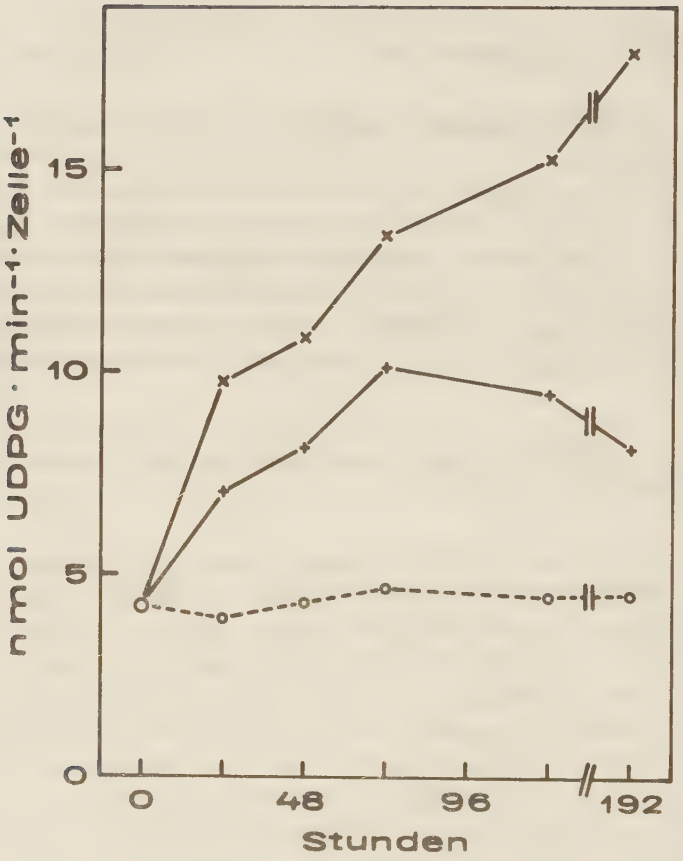

Abb. 4a

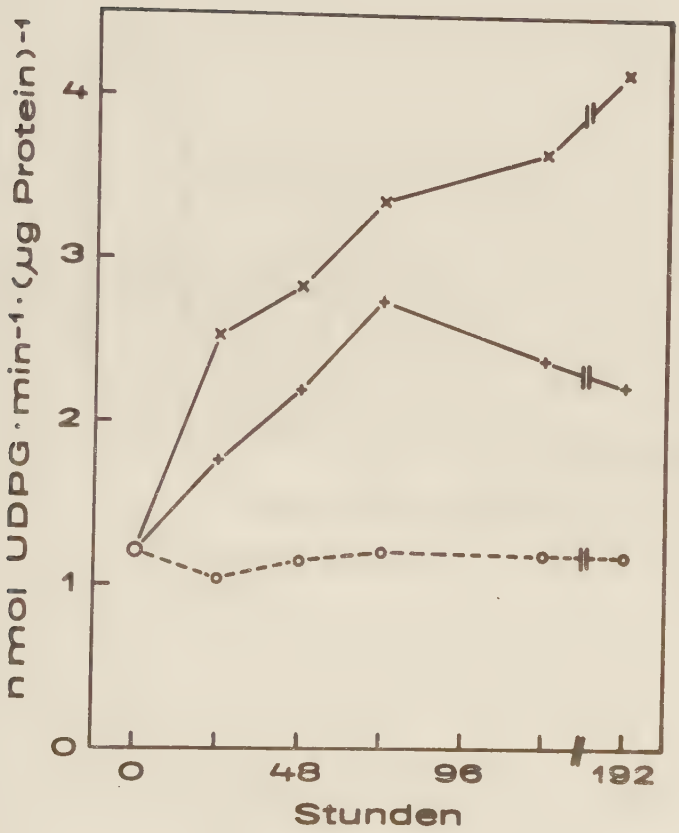

Abb. 4b

Abb. 4
Aktivierung der UDPG-Pyrophosphorylase durch einen Blaulichtpuls von 5 min Dauer.
Nach einer dreiwöchigen Rotlichtbestrahlung wurden Zellen einem einmaligen Blaulichtpuls von 4,8 Watt für 5 Minuten ausgesetzt. Der anschließende Aktivitätsverlauf der UDPG-Pyrophosphorylase im Rotlicht ist dargestellt (+ - +). Zur Kontrolle wurde ein Teil der Zellen ins Dauerblaulicht gebracht (X - X), ein anderer blieb im Rotlicht ohne Zusatzblaulicht (o - o).
a) Aktivität / Zelle
b) Spezifische Aktivität
Die Proteinbestimmung erfolgte im Rohextrakt nach BRADFORD (1976).

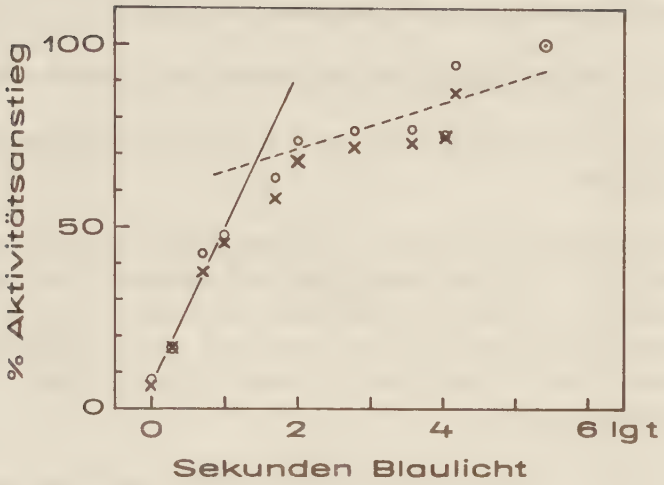

Abb. 5
Fluenz-Effektkurve für die Steigerung der UDPG-Pyrophosphorylase-Aktivität durch Blaulicht.
Die Induktion erfolgte nach einer dreiwöchigen Rotlichtbestrahlung durch Blaulichtpulse (4,8 $W*m^{-2}$) unterschiedlicher Dauer.
Nach dem Blaulichtpuls wurde die Bestrahlung mit Rotlicht auf drei Tage ergänzt und anschließend die Enzymaktivität bestimmt.
0: Aktivitätsanstieg nach dreitägigem Dauerblaulicht
o: Aktivitätsanstieg bezogen auf Protein
x: Aktivitätsanstieg bezogen auf Zelle
Der Aktivitätsanstieg während dreitägiger Dauerblaulichtbestrahlung wurde 100% und für die Rotlichtkontrollen (ohne Blaulichtpuls) 0% gesetzt.

lichtbestrahlung wurde dann die Enzymaktivität gemessen (Abb.5). Die halblogarithmische Auftragung läßt einen zweiphasigen Verlauf der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Dauer der Blaulichtpulse erkennen: Eine Phase starker Wirkung im Bereich <100 Sekunden Blaulicht und eine, bei der die Enzymaktivität mit zunehmender Blaulichtmenge nur langsam ansteigt (>100 Sekunden Blaulicht).

1.2. Untersuchungen zum Mechanismus der Enzymkontrolle

1.2.1. Unabhängigkeit der Enzymaktivitätsänderungen vom Zellkern.

Die Aktivitätssteigerung der UDPG-Pyrophosphorylase ist auch bei mit Rotlicht vorbehandelten kernlosen Zellen möglich (Abb. 3). Diese Unabhängigkeit der Enzymaktivierung von der Anwesenheit des Zellkerns schließt eine direkte Kontrolle durch den Zellkern aus und wirft die Frage nach der Kontrollstelle auf.

1.2.2. Mischung von Extrakten aus Rot- und Blaulichtzellen

Bei Anwesenheit von Aktivatoren oder Inhibitoren in Extrakten verhalten sich Enzymaktivitäten in Mischungen solcher Extrakte unterschiedlicher Herkunft nicht additiv (SCHOPFER, 1972). Dies wurde im folgenden Experiment überprüft. Rohextrakte, die aus Zellen gewonnen wurden, welche im Rot- oder Blaulicht gehalten worden waren, wurden in verschiedenen Verhältnissen miteinander vermischt. Die anschließend gemessenen Enzymaktivitäten verhielten sich in jedem Mischungsverhältnis additiv (Abb. 6).

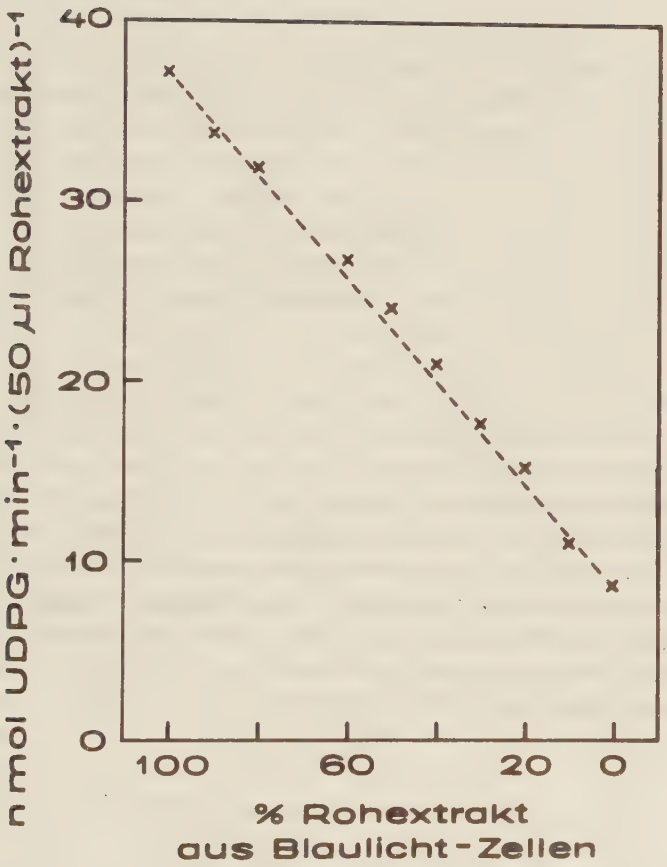
n mol UDPG · min⁻¹ · (50 µl Rohextrakt)⁻¹
40
30
20
10
0
100
60
20
0
% Rohextrakt
aus Blaulicht-Zellen

Abb. 5

Abb. 6

UDPG-Pyrophosphorylase-Aktivität in Mischungen von Rohextrakten aus Rot- und Blaulichtzellen.
Aliquots aus Rohextrakten von Zellen aus Blaulicht (21 Tage) oder Rotlicht (21 Tage) wurden in unterschiedlichem Verhältnis miteinander vermischt. Die %-Angaben beziehen sich auf 50 µl Rohextrakt aus Blaulichtzellen, der Rest zu 100% auf 50 µl Rohextrakt aus Rotlichtzellen.
Die Aktivitäten verhalten sich additiv.

1.2.3. Der Einfluß von Translationsinhibitoren auf den blaulichtinduzierten Aktivitätsanstieg des Enzyms

1.2.3.1. Cycloheximid

Zellen von Acetabularia mediterranea wurden mit Rotlicht vorbehandelt. Dann wurde den Zellen Cycloheximid in unterschiedlichen Konzentrationen ins Medium gegeben. Die Zellen blieben über Nacht im Rotlicht und wurden anschließend ins Blaulicht gebracht; je eine Kontrolle verblieb im Rotlicht. Die Zellen verhielten sich bei Anwesenheit von Cycloheximid im Rot- und Blaulicht unterschiedlich: Während sie im Rotlicht wochenlang ohne Schädigungen gehalten werden konnten, wies ein großer Teil der Zellen im Blaulicht nach kurzer Zeit sichtbare Schäden auf (abgestorbene Zellspitzen). Für die Aufarbeitung wurden daher nur solche Zellen aus dem Blaulicht berücksichtigt, die nicht geschädigt waren.
Mit zunehmender Cycloheximid-Konzentration wird die durch Blaulicht bewirkte Steigerung der Enzymaktivität geringer (Abb. 7). Bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml (=1,78 µmol/l) ist die Zunahme der Aktivität vollständig unterdrückt. Daß es sich dabei jedoch nicht um irreversible Schädigungen der Zellen handelt, belegt der Anstieg der Enzymaktivität nach Auswaschen des Antibioticums (Abb. 8). Dieser verläuft dann parallel zu dem der unbehandelten Zellen.

1.2.3.2. Chloramphenicol

Die Zellen wurden nach einer Rotlichtvorbehandlung mit Chloramphenicol (50 µg/ml) inkubiert und anschließend mit Blaulicht bestrahlt. Bei den mit Chloramphenicol behandelten Zellen konnte kein Unterschied der Aktivitätssteigerung der UDPG-Pyrophosphorylase im Blaulicht zu den unbehandelten Kontrollen nachgewiesen werden (Abb. 9).

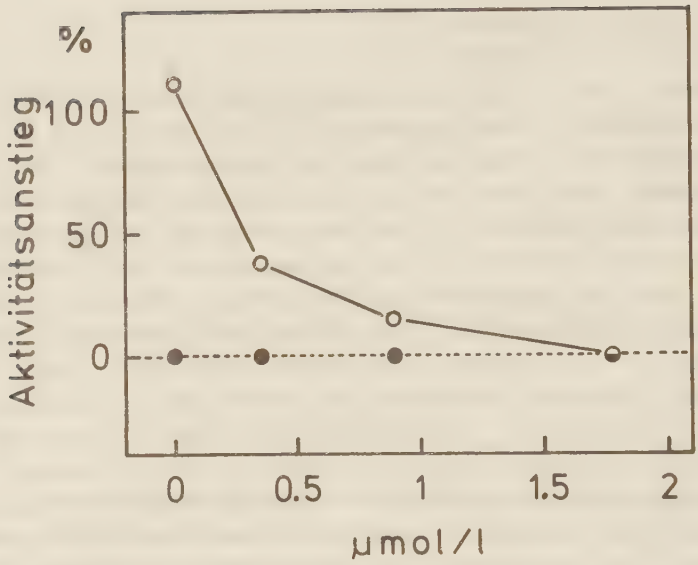

Abb. 7
Hemmung des Aktivitätsanstiegs der UDPG-Pyrophosphorylase während Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung durch Cycloheximid (Dosiseffektkurve).
Zellen von Acetabularia mediterranea wurden 21 Tage mit Rotlicht vorbehandelt und anschließend in Anwesenheit von Cycloheximid unterschiedlicher Konzentration ins Blaulicht übertragen. Nach 4 Tagen wurde die spezifische Aktivität des Enzyms gemessen und der Aktivitätsanstieg (in %) im Vergleich zu mit gleichen Cycloheximid-Konzentrationen behandelten Rotlichtkontrollen (= 0%) berechnet.
o --- o: Zellen nach Blaulichtbestrahlung
● --- ●: Rotlichtkontrollen
Bei einer Cycloheximid-Konzentration von 1,78 µmol/l (=0,5 µg/ml) ist der Aktivitätsanstieg während der Blaulichtbestrahlung vollständig gehemmt.

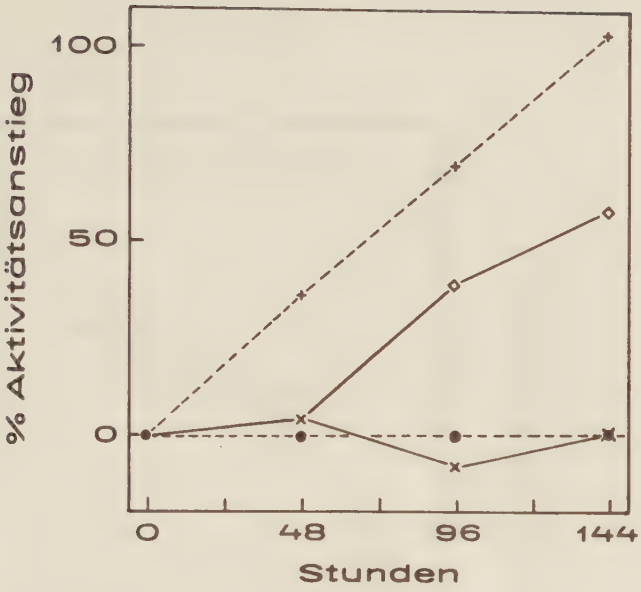

Abb. 8

Verlauf des UDPG-Pyrophosphorylase-Aktivitätsanstiegs während Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung in Gegenwart von Cycloheximid.

Zellen von Acetabularia mediterranea wurden für 21 Tage im Rotlicht gehalten und anschließend zu einem Teil der Zellen Cycloheximid (1,78 µmol/l) ins Kulturmedium gegeben. Nach 12 Stunden wurden die Zellen mit Ausnahme der Rotlichtkontrollen ins Blaulicht gebracht (Zeitpunkt 0 h). Bei einigen Zellen wurde das Cycloheximid nach 48 Stunden wieder ausgewaschen.

Die Abbildung zeigt den prozentualen Anstieg der spezifischen Aktivität der UDPG-Pyrophosphorylase in % bezogen auf die jeweiligen Rotlichtkontrollen (0%).

+ --- +: Blaulicht ohne Cycloheximid

x --- x: Blaulicht mit Cycloheximid

◇ --- ◇: Aktivität im Blaulicht nach Auswaschen des Inhibitors

● --- ●: jeweilige Rotlichtkontrollen mit oder ohne Cycloheximid (0% Aktivitätsanstieg)

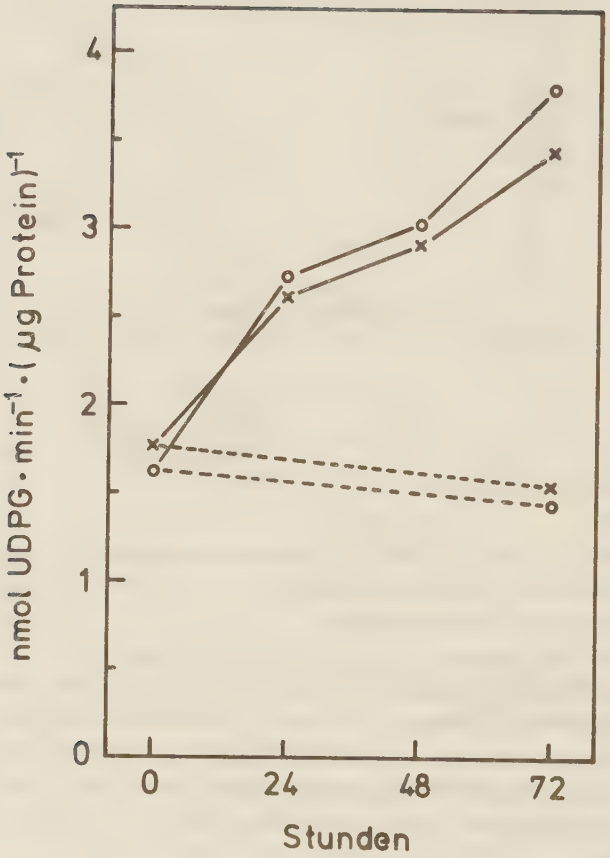

Abb. 9

Abb. 9
Einfluß von Chloramphenicol auf die Steigerung der UDPG-Pyrophosphorylase-Aktivität durch Blaulicht.
Acetabularien wurden 21 Tage mit Rotlicht vorbehandelt. Ein Teil der Zellen wurde anschließend in ein Nährmedium gebracht, das 50 µg/ml Chloramphenicol enthielt. Mit Ausnahme der Rotlichtkontrollen wurden die Zellen dann ins Blaulicht übertragen (Zeitpunkt 0 h).
Aufarbeitung der Zellen zu den angegebenen Zeiten.
Die Bestimmung der löslichen Proteine im Rohextrakt erfolgte mit der Methode von BRADFORD (1976).
X: Zellen mit Chloramphenicol
o: Zellen ohne Chloramphenicol
---- Rotlichtkontrollen

Die Frage nach einer de novo Synthese wurde experimentell mit Hilfe der Dichtemarkierung und anschließender isopyknischer Zentrifugation überprüft. Für eine schlüssige Interpretation ist es jedoch notwendig, dies wird im Abschnitt "Diskussion" noch zu erörtern sein, eine "interne Kontrolle" einzusetzen. Hierfur wurde ein Enzym ausgewählt, das im Gegensatz zur UDPG-Pyrophosphorylase keine Blaulichtabhängigkeit seiner spezifischen Aktivität zeigt. Das lichtabhängige Verhalten dieses Enzyms wird im Folgenden beschrieben; anschließend werden dann die Ergebnisse der Dichtemarkierungsexperimente dargestellt.

2. Hydroxypyruvat-Reductase

2.1. Die Aktivität der Hydroxypyruvat-Reductase im Rot- und Blaulicht

Im Rotlicht ist nach einer leichten Aktivitätssteigerung während des gesamten Versuchszeitraums eine konstante Enzymaktivität zu beobachten. Im Dauerblaulicht, sowie während Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung nimmt die Enzymaktivität pro Zelle deutlich zu. Jedoch ist der Anstieg erheblich geringer als bei der UDPG-Pyrophosphorylase (Abb. 10).
Unter denselben Bedingungen sind jedoch bei der spezifischen Aktivität der Hydroxypyruvat-Reductase keine wesentlichen blaulichtabhängigen Änderungen feststellbar (Abb. 11). So steigt während einer Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung die spezifische Aktivität des Enzyms nicht an. Damit verhält sich die Hydroxypyruvat-Reductase wie der Durchschnitt aller Proteine und unterscheidet sich hierin grundlegend von der UDPG-Pyrophosphorylase.

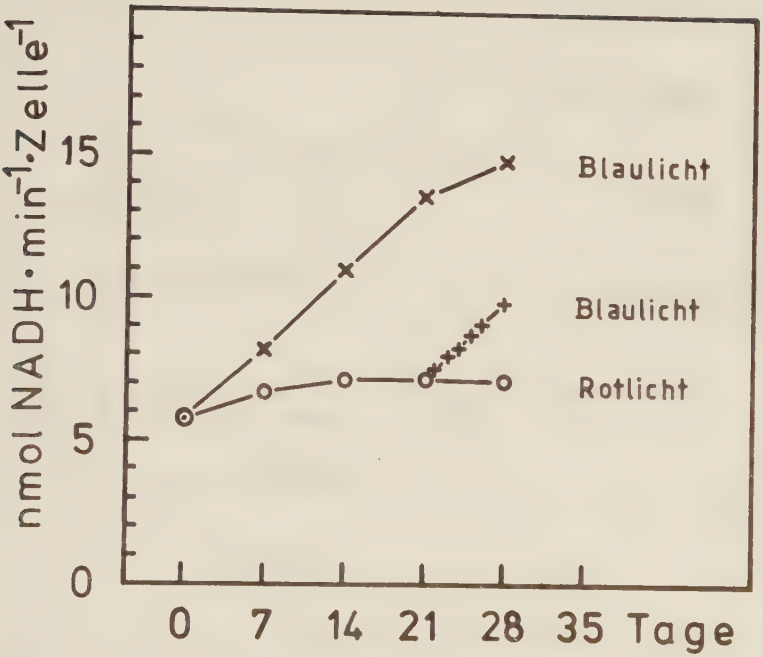

Abb. 10
Aktivität der Hydroxypyruvat-Reductase im Rot- und Blaulicht, sowie nach Übertragung der Zellen nach 21 Tagen Rotlicht ins Blaulicht.
Versuchsdurchführung wie in Abbildung 1.

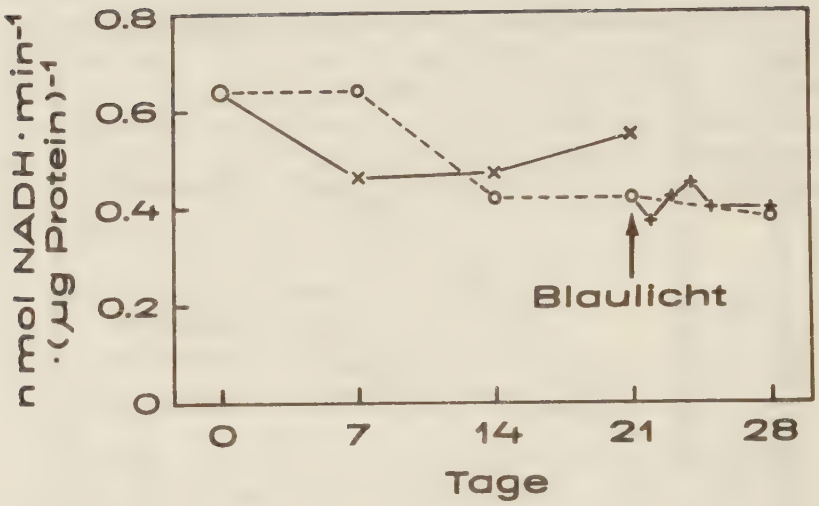

Abb. 11
Spezifische Aktivität der Hydroxypyruvat-Reductase im Rot- und Blaulicht, sowie während Blaulichtbestrahlung nach 21tägiger Rotlichtbestrahlung.
Versuchsdurchführung wie in Abbildung 2.
o --- o: spezifische Aktivität im Dauerrotlicht
x --- x: spezifische Aktivität im Dauerblaulicht
+ --- +: spezifische Aktivität im Blaulicht nach Rotlichtvorbehandlung

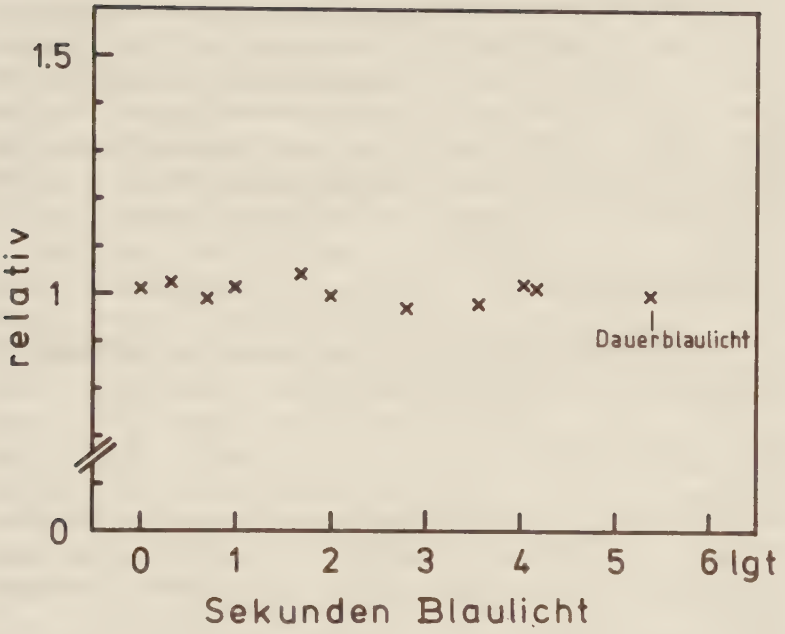

Abb. 12
Die Abhängigkeit der Hydroxypyruvat-Reductase von der Blaulichtfluenz.
Experimentelle Bedingungen wie in Abbildung 5.
Die Aktivität der Rotlichtkontrolle wurde gleich 1 gesetzt.
Die Ordinate stellt die relative spezifische Enzymaktivität bezogen auf die Rotlichtkontrolle dar.

2.2. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Blaulichtfluenz

Nach einer Rotlichtvorbehandlung wurden Zellen von Acetabularia mediterranea mit Blaulichtpulsen von einer Sekunde Länge bis zu dreitägigem Dauerblaulicht bestrahlt. Dann wurde die Aktivität der Hydroxypyruvat-Reductase bestimmt (Abb. 12). Gegenüber den nur mit Rotlicht behandelten Kontrollen zeigen die mit zusätzlichem Blaulicht bestrahlten Zellen keine Unterschiede in der Enzymaktivität.

3. Dichtemarkierung

3.1. Dichtemarkierung während dreitägiger Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung

3.1.1. Ganze Zellen

Zellen von Acetabularia mediterranea wurden nach einer dreiwöchigen Rotlichtbestrahlung während anschließender Blaulichtbestrahlung mit deuterierten Aminosäuren dichtemarkiert.
Nach dieser Phase zeigten etwa 40-50% der Zellen Schädigungen, d.h. den Zellspitzen fehlte das Cytoplasma. Es wurden daher für die Aufarbeitung nur Zellen ausgewählt, die keine sichtbaren Schäden aufwiesen. Diese Zellen hatten zu 20% Wirtel gebildet, der Rest besaß charakteristisch verlängerte Zellspitzen (CLAUSS, 1968). Die Zellen der Rotlichtkontrollen waren dagegen nach der Dichtemarkierung fast ausnahmslos ungeschädigt.
Die Rohextrakte der Zellen wurden anschließend im $RbCl/D_2O$-Gradienten isopyknisch zentrifugiert. Die Aktivitätsprofile der UDPG-Pyrophosphorylase und der Hydroxypyruvat-Reductase wurden nach der Dichtemarkierung mit Hilfe eines Computers analysiert und in einen markierten und einen unmarkierten Anteil zerlegt (Abb. 13).

Die auf eine Zelle umgerechnete Aktivität der UDPG-Pyrophosphorylase im dichtemarkierten Anteil beträgt je nach Experiment das 2,6 bis 3,3fache der Rotlichtkontrollen. Für die Hydroxypyruvat-Reduktase liegt diese Aktivität beim 2,1 bis 2,2fachen der Rotlichtkontrollen.

3.1.2. Kernlose Zellteilstücke

In einem weiteren Experiment wurde die Dichtemarkierung während einer dreitägigen Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung auch an kernlosen Zellteilstücken durchgeführt. Bei einem den vorigen Experimenten entsprechenden Versuchsansatz wurde hierzu den Zellen zwei Tage vor Beginn der Blaulichtbestrahlung das Rhizoid entfernt.
In Umkehrung der Verhältnisse bei kernhaltigen Zellen waren nach dreitägiger Dichtemarkierung die mit Blaulicht bestrahlten Zellen nur zu 10% geschädigt. Der Rest wies Wirtel oder ausgewachsene Zellspitzen auf. Dagegen waren die Zellen der Rotlichtkontrollen zu 40% sichtbar geschädigt oder tot und mußten selektioniert werden.
Die isopyknische Zentrifugation der Rohextrakte im Dichtegradienten und die anschließende Analyse der Aktivitätsprofile erbrachte ein den kernhaltigen Zellen vergleichbares Ergebnis (Abb. 14). Die Aktivität/Zelle war nach dreitägiger Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung im markierten Teil des Aktivitätsprofils gegenüber den Rotlichtkontrollen sowohl für die UDPG-Pyrophosphorylase (6,8 : 1) als auch für die Hydroxypyruvat-Reductase (5 : 1) deutlich erhöht.

3.2. Dichtemarkierung bei Induktion durch Blaulichtpuls

Wie in den vorigen Experimenten wurden die Zellen für 3 Wochen mit Rotlicht vorbehandelt. Zu Beginn der dreitägigen Dichtemarkierung erhielt ein Teil der Zellen einen Blaulichtpuls von einer Minute Dauer. Nach weiterer dreitägiger

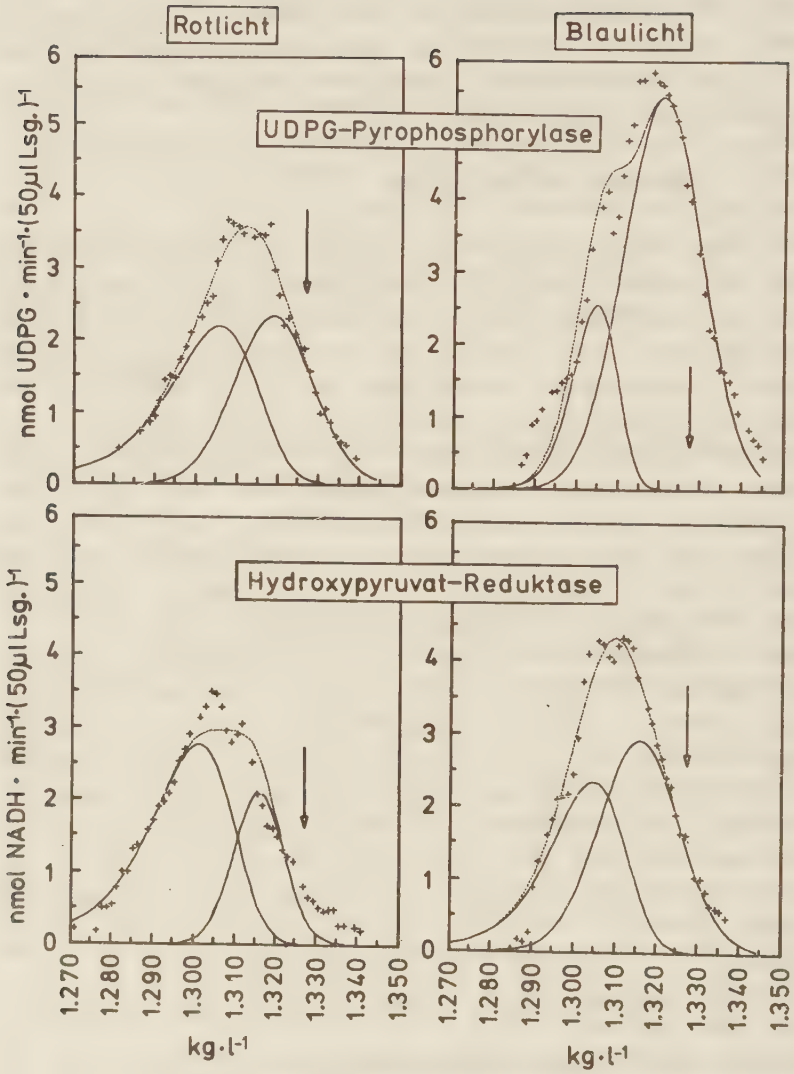
Rotlicht
Blaulicht
UDPG-Pyrophosphorylase
nmol UDPG · min⁻¹·(50µl Lsg.)⁻¹
Hydroxypyruvat-Reduktase
nmol NADH · min⁻¹·(50µl Lsg.)⁻¹
0
1
2
3
4
5
6
1.270
1.280
1.290
1.300
1.310
1.320
1.330
1.340
1.350
kg·l⁻¹

Abb. 13

Abb. 13
Aktivitätsprofile der UDPG-Pyrophosphorylase und der Hydroxypyruvat-Reductase nach dreitägiger Markierung mit deuterierten Aminosäuren im Rot- und Blaulicht;
kernhaltige Zellen.
Nach dreiwöchiger Rotlichtvorbehandlung wurden die Zellen 3 Tage mit Blaulicht bestrahlt. Ein Teil der Zellen blieb zur Kontrolle jedoch im Rotlicht. Während dieser Zeit wurde mit deuterierten Aminosäuren markiert, danach homogenisiert und der Rohextrakt im $RbCl/D_2O$ - Gradienten zentrifugiert.
Der Pfeil gibt die Position (Peak-Maximum) des externen Markers (β-Galactosidase) an.
Die punktierte Linie stellt jeweils die mittels Computerprogramm ermittelte Resultierende zweier sich überlappender Verteilungen dar.

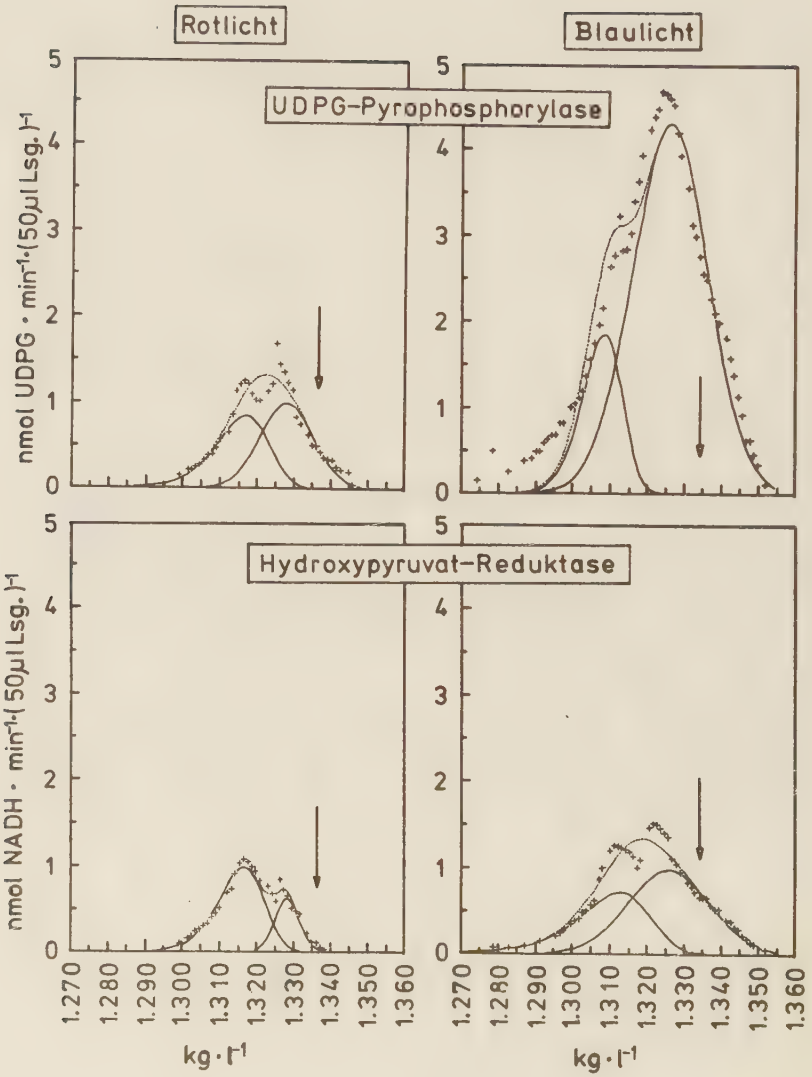
Rotlicht
Blaulicht
UDPG-Pyrophosphorylase
nmol UDPG · min⁻¹·(50µl Lsg.)⁻¹
Hydroxypyruvat-Reduktase
nmol NADH · min⁻¹·(50µl Lsg.)⁻¹
0
1
2
3
4
5
1.270
1.280
1.290
1.300
1.310
1.320
1.330
1.340
1.350
1.360
kg · l⁻¹

Abb. 14

Abb. 14
Aktivitätsprofile der UDPG-Pyrophosphorylase und der Hydroxypyruvat-Reductase im Dichtgradienten nach dreitägiger Markierung mit deuterierten Aminosäuren im Rot- bzw. Blaulicht;
kernlose Zellteilstücke.
Versuchsdurchführung wie in Abbilgung 13. Zusätzlich wurde den Zellen 2 Tage vor der Dichtemarkierung durch Resektion des Rhizoids der Kern entfernt.
Der Pfeil zeigt die Position des externen Markers.
Die Resultierende zweier Verteilungen ist jeweils als gepunktete Linie dargestellt.

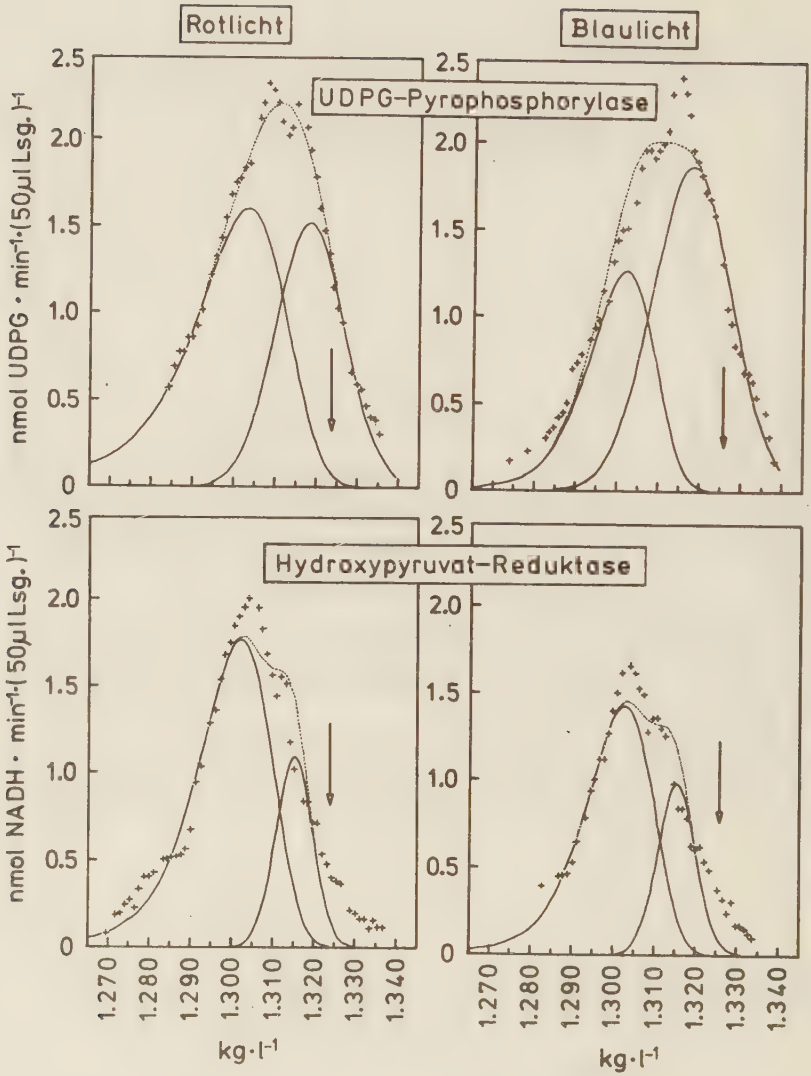
Rotlicht
Blaulicht
UDPG-Pyrophosphorylase
Hydroxypyruvat-Reduktase
nmol UDPG · min⁻¹·(50µl Lsg.)⁻¹
nmol NADH · min⁻¹·(50µl Lsg.)⁻¹
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
1.270
1.280
1.290
1.300
1.310
1.320
1.330
1.340
kg·l⁻¹

Abb. 15

Abb. 15
Aktivitätsprofile der UDPG-Pyrophosphorylase und der Hydroxypyruvat-Reductase nach dreitägiger Markierung mit deuterierten Aminosäuren im Rotlicht, bzw. im Rotlicht nach einminütiger Blaulichtbestrahlung zu Beginn der Markierung.
Die Zellen wurden nach dreiwöchiger Rotlichtbestrahlung für drei Tage mit deuterierten Aminosäuren markiert, anschließend homogenisiert und der Rohextrakt im $RbCl/D_2O$ - Gradienten zentrifugiert.
Ein Teil der Zellen erhielt zu Beginn der Markierung einen Blaulichtpuls von einer Minute Dauer (4,8 $W*m^{-2}$), der andere Teil diente als Rotlichtkontrolle. Während der Markierung wurde die Rotlichtbestrahlung fortgesetzt.
Der Pfeil gibt die Position des externen Markers an.
Die gepunktete Linie stellt jeweils die Resultierende von zwei Verteilungen dar.

Rotlichtbestrahlung wurden die Zellen aufgearbeitet.
Ein Teil der dem Blaulichtpuls ausgesetzten Zellen wies wiederum die charakteristischen Schädigungen auf (ca. 50%) und mußte selektioniert werden. Die ungeschädigten Zellen besaßen zu 60% Wirtel.
Die Auswertung dieser Experimente ergab für die UDPG-Pyrophosphorylase nach einmaligem Blaulichtpuls eine Zunahme der Enzymaktivität/Zelle im markierten Aktivitätsanteil um das 1,5 bis 1,9fache bezogen auf die Rotlichtkontrolle (Abb. 15).
Die Untersuchung der Hydroxypyruvat-Reductase brachte hier kein eindeutiges Ergebnis: In einem Experiment konnte keine Steigerung der Enzymaktivität/Zelle gegenüber der Rotlichtkontrolle festgestellt werden. In einem anderen wurde eine Steigerung um das 1,9fache gemessen.

3.3. Bestimmung des Enzymabbaus im Rot- und Blaulicht

In einem den vorher beschriebenen Experimenten vergleichbaren Versuchsansatz wurde der Enzymabbau verfolgt und die Halbwertszeiten beider Enzyme bestimmt.
Hierzu wurden nach längerer Rotlichtvorbehandlung Zellen von Actabularia mediterranea im Rot- und Blaulicht dichtemarkiert und nach 1, 2 und 3 Tagen jeweils ein Teil der Zellen aufgearbeitet.
Dabei wurde bei den im Blaulicht gehaltenen Zellen wiederum die charakteristischen Schädigungen beobachtet (Tab. 1).

Tabelle 1
Zustand der Zellen nach 1,2 und 3 Tagen Dichtemarkierung im Blaulicht

	1. Tag	2. Tag	3. Tag
geschädigte Zellen	10%	25%	50%
Anzahl der selektionierten,ungeschädigten Zellen	50	42	50
davon:			
mit Wirtel	25%	30%	50%
intakte Spitzen ohne Wirtel	75%	70%	50%

Die Abnahme des unmarkierten Anteils am jeweiligen Aktivitätsprofil in den Abbildungen 16a und 16b repräsentiert den Abbau des Enzyms. Dieser Anteil wurde für jeden Tag auf Aktivität pro Zelle umgerechnet und mit der Enzymaktivität vor der Dichtemarkierung (Tag 0 = 100%) verglichen.
Bei halblogarithmischer Auftragung gegen die Zeit liegen die Werte annähernd auf einer Geraden (Abb. 17). Dies läßt die Annahme zu, daß der Abbau einer Kinetik 1.Ordnung folgt.
Aus den Ausgleichsgeraden lassen sich die Halbwertszeiten der Enzyme bestimmen. Für die UDPG-Pyrophosphorylase wurde unabhängig von der Lichtqualität eine Halbwertszeit von 2,6 Tagen ermittelt. Für die Hydroxypyruvat-Reductase ergaben sich unterschiedliche Halbwertszeiten: Im Rotlicht 8,4 Tage, im Blaulicht dagegen 4,1 Tage.
Die hieraus folgenden Geschwindigkeitskonstanten für den Enzymabbau (kd-Werte) sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

1.Tag
2.Tag
3.Tag
nmol UDPG · min⁻¹·(50µl Lsg.)⁻¹
kg·l⁻¹
1.270
1.280
1.290
1.300
1.310
1.320
1.330
1.340
1.350
1.360
0
1
2
3
4
5
6

Abb. 16a

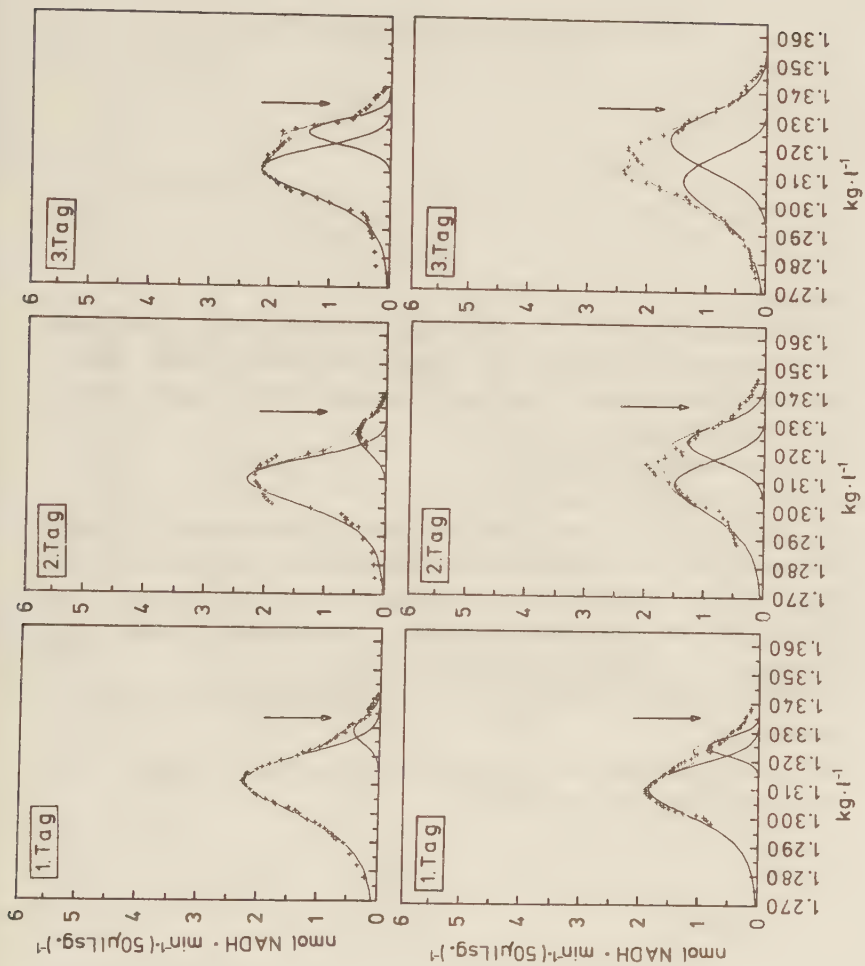
1.Tag
2.Tag
3.Tag
nmol NADH · min⁻¹(50µlLsg.)⁻¹
kg·l⁻¹
1.270
1.280
1.290
1.300
1.310
1.320
1.330
1.340
1.350
1.360
0
1
2
3
4
5
6

Abb. 16b

Abb. 16
Aktivitätsprofile der UDPG-Pyrophosphorylase und der Hydroxypyruvat-Reductase im Dichtegradienten nach ein-, zwei- und dreitägiger Dichtemarkierung im Rot- (obere Reihe) und Blaulicht (untere Reihe).
a) UDPG-Pyrophosphorylase
b) Hydroxypyruvat-Reductase
Die Zellen wurden nach 3 Wochen Rotlichtbestrahlung im Rot- oder Blaulicht mit deuterierten Aminosäuren inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte 1, 2 oder 3 Tage nach Beginn der Markierung. Anschließend wurden die Zellextrakte im RbCl/D_2O - Gradienten isopyknisch zentrifugiert.
Der Pfeil zeigt die Position des externen Markers (β-Galactosidase).
Die Resultierende von zwei Verteilungen ist jeweils als punktierte Linie dargestellt.

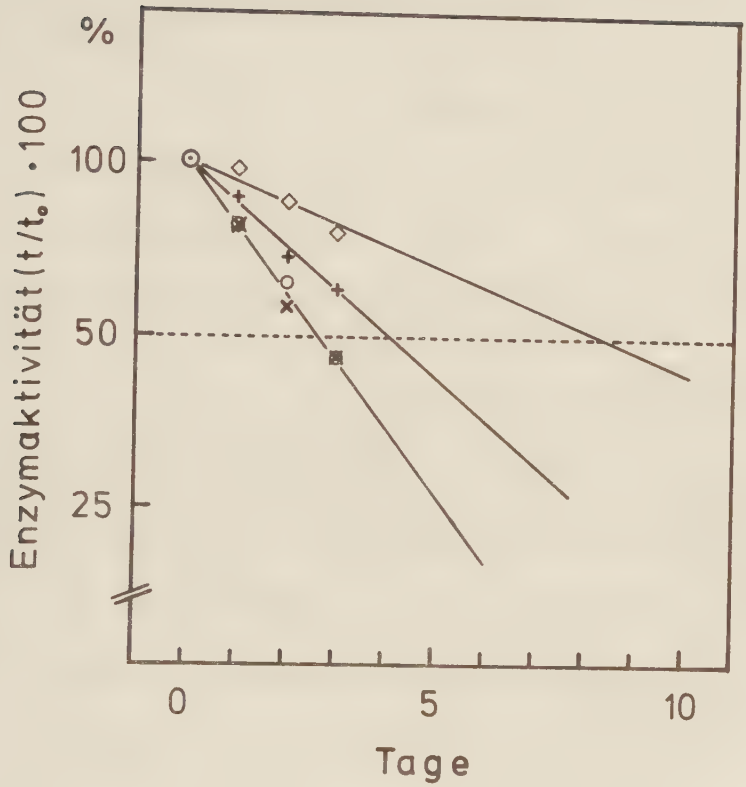

Abb. 17

Abb.17
Abnahme des unmarkierten Anteils der UDPG-Pyrophosphorylase und der Hydroxypyruvat-Reductase während der Dichtemarkierung;
halblogarithmische Auftragung (ln).
Die Werte wurden aus der quantitativen Analyse von Aktivitätsprofilen nach Dichtemarkierungsexperimenten gewonnen. Aufgetragen ist der unmarkierte Anteil der jeweiligen Gesamtaktivität des Enzyms zur Zeit t bezogen auf eine Zelle.
Die Schnittpunkte der Regressionsgeraden mit der 50% - Linie ergeben die Halbwertszeiten t1/2.
Anfangsaktivität zu Beginn der Dichtemarkierung (t0) entspricht 100%.
o : UDPG-Pyrophosphorylase-Aktivität im Rotlicht
x : UDPG-Pyrophosphorylase-Aktivität im Blaulicht nach Rotlichtvorbehandlung
◇ : Hydroxypyruvat-Reductase-Aktivität im Rotlicht
+ : Hydroxypyruvat-Reductase-Aktivität im Blaulicht nach Rotlichtvorbehandlung

Tabelle 2
Kd-Werte für den Abbau der UDPG-Pyrophosphorylase und der Hydroxypyruvat-Reductase im Rot- und Blaulicht
(Einheit: 1/Tag)

	Rotlicht	Blaulicht
UDPG-Pyrophosphorylase	0,2615	0,2615
Hydroxypyruvat-Reductase	0,0825	0,1691

3.4. Ergebnisse aus der Dichtemarkierung unter Berücksichtigung des Enzymabbaus

Da die Enzymdestruktion markierte und unmarkierte Moleküle gleichermaßen betrifft (PRICE und STEVENS, 1982), wurden die Ergebnisse der Dichtemarkierung unter Berücksichtigung des jeweiligen Enzymabbaus überprüft. Dazu wurde der unter Material und Methoden (Kap. II 2.8.6.) dargestellte mathematische Ansatz gewählt.
Das Verhältnis der Dichtemarkierung der UDPG-Pyrophosphorylase im Rot- und Blaulicht wird dadurch nicht verändert, da die Abbauraten unter beiden Lichtverhältnissen gleich sind (Abb.17).
Die Abbauraten der Hydroxypyruvat-Reductase sind dagegen im Rot- und Blaulicht unterschiedlich (Abb. 17). Daher sind leichte Korrekturen erforderlich, die das Gesamtergebnis jedoch nur unwesentlich verändern: Das Verhältnis Blaulicht- zu Rotlichtmarkierung nach dreitägiger Blaulichtbestrahlung verschiebt sich für kernhaltige Zellen von 2,2 auf 2,3 und für kernlose Zellteilstücke von 5 auf 6,2. Für die Dichtemarkierung bei Induktion durch einen zweiminütigen Blaulichtpuls ergibt sich folgende Situation. In dem Experiment ohne Steigerung der Enzymaktivität /Zelle gegenüber der

Rotlichtkontrolle kann keine Veränderung festgestellt werden, in dem anderen Experiment ändert sich das Verhältnis von 1,9 auf 2,1.

4. Modellrechnungen auf der Grundlage der vorliegenden experimentellen Ergebnisse

4.1. Computergestützte Berechnungen der Gehalte an UDPG-Pyrophosphorylase und Hydroxypyruvat-Reductase auf der Basis der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten während unterschiedlicher Lichtbedingungen

4.1.1. Dauerrot- und Dauerblaulicht

Grundlage für die Modellrechnung der Enzymgehalte ist die Gleichung 6 (Kap. II 2.8.9.). Sie geht, bezogen auf die jeweils vorhandene Enzymmenge, von einer Abbaukinetik 1. Ordnung und einer Synthesekinetik 0. Ordnung aus.
Um den Verlauf der Enzymgehalte im Rot- und Blaulicht berechnen zu können, ist außer der Kenntnis der Geschwindigkeitskonstanten für den Enzymabbau (kd-Wert) die der Anfangsgeschwindigkeitskonstanten (ksO-Wert, d.h. Geschwindigkeitskonstante zu Versuchsbeginn) Voraussetzung. Außerdem müssen Proteinsyntheseratenfaktorfunktionen berücksichtigt werden, die nach Messungen der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten von Acetabularia mediterranea in Dauerrotlicht, Dauerblaulicht sowie während Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung oder nach einem Blaulichtpuls von 2 Minuten Dauer angesetzt wurden (siehe Kap. II 2.8.3.). Die Geschwindigkeitskonstante (ksO) in Gleichung 6 muß daher mit der sich zeitlich ändernden Faktorfunktion fi(t) multipliziert werden. Diese beschreibt den Verlauf der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten in den jeweiligen Lichtverhältnissen.
Durch Lösen der daraus folgenden Differentialgleichung

(Gl.7) unter Einbeziehung von Gleichung 3 für Dauerrotlicht und Gleichung 4 für Dauerblaulicht ergaben sich schließlich Gleichungen für die Enzymgehalte im Dauerrot- (Gl.8) und im Dauerblaulicht (Gl.9).

Mit Hilfe der experimentell bestimmten Enzymaktivitäten, den aus der Dichtemarkierung ermittelten kd-Werten und den zuletzt aufgeführten Funktionen (8 und 9) wurden über die least square Methode die Anfangsgeschwindigkeitskonstanten für den Zeitpunkt t=0 (Beginn der monochromatischen Bestrahlung) zurückgerechnet.

Für die UDPG-Pyrophosphorylase waren die im Dauerrotlicht immer gleichen Anfangsgeschwindigkeitskonstanten mit denen im Dauerblaulicht nur dann nahezu identisch, wenn ausschließlich die gemessenen Enzymaktivitäten der ersten 14 Tage berücksichtigt wurden. Bei Einbeziehung von Meßwerten aus späteren Zeiträumen ergaben sich abweichende Anfangsgeschwindigkeitskonstanten (ksO-Werte, Tab.3).

Der einheitliche physiologische Zustand des Algenmaterials zu Versuchsbeginn macht es jedoch notwendig, daß die ksO-Werte für beide Lichtbedingungen gleich sind.

Die für die Hydroxypyruvat-Reductase ermittelten ksO-Werte stimmen dagegen im untersuchten Zeitraum unabhängig von der Lichtqualität gut überein (Tab.3).

Tabelle 3

KsO-Werte für die UDPG-Pyrophosphorylase und die Hydroxypyruvat-Reductase unter Berücksichtigung verschiedener Zeiträume im Rot- und Blaulicht

	UDPG-Pyrophosphorylase nmol UDPG*1,44*10^3min^{-2} *(50 µl Enzymlsg.)$^{-1}$		Hydroxypyruvat-Reductase nmol NADH*1,44*10^3min^{-2} *(50 µl Enzymlsg.)$^{-1}$	
Tage	Rotlicht	Blaulicht	Rotlicht	Blaulicht
14	0,3002	0,2945	0,1100	0,1132
21	0,3012	0,3137	0,1100	0,1131
28	0,3021	0,3559	0,1100	0,1130
35	0,3046	0,3985	-	-

Für die weiteren Rechnungen wurde bei beiden Enzymen von jeweils einer gemeinsamen Anfangsgeschwindigkeitskonstanten (ksO) ausgegangen. Aus den nahezu identischen ksO-Werten, kalkuliert für Dauerrot- und Dauerblaulichtbeginn (Tab.3) wurde hierfür der Mittelwert für die Anfangsgeschwindigkeitskonstanten gewählt.

Damit lassen sich mit Hilfe der Gleichungen 8 und 9 die Enzymgehalte zu verschiedenen Zeitpunkten berechnen, wobei die zugrundeliegenden Syntheseraten den experimentell bestimmten durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten folgen.

Vergleicht man die so berechneten Enzymaktivitäten beider Enzyme mit den entsprechenden experimentellen Messungen im Rot- und Blaulicht, ergibt sich eine weitgehende Übereinstimmung (Abb. 18 und 19). Für die UDPG-Pyrophosphorylase trifft diese Übereinstimmung im Dauerblaulicht jedoch nur während der ersten 14 Tage zu. Zu späteren Zeitpunkten sind die experimentell bestimmten Meßwerte weitaus größer als die

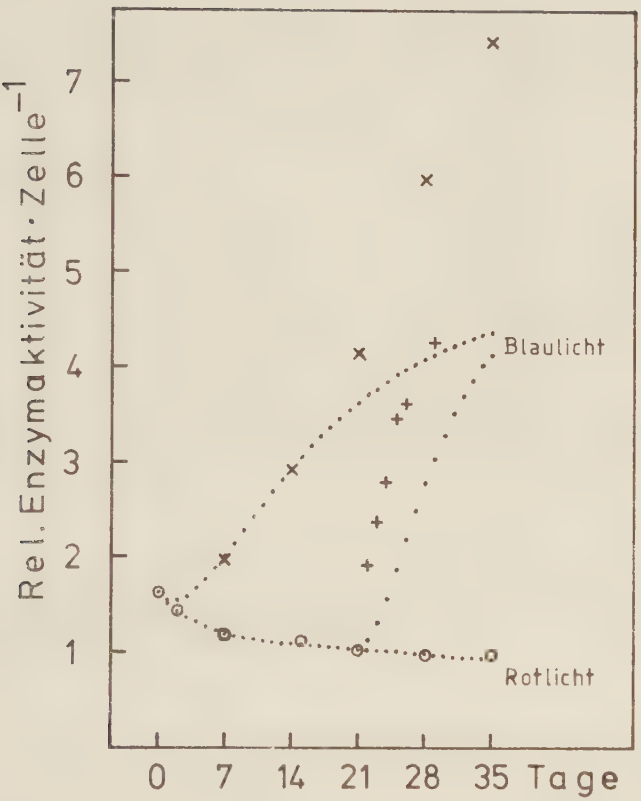

Abb. 18
Vergleich von Modellrechnungen mit exprimentell bestimmten Aktivitäten der UDPG-Pyrophosphorylase im Rot- und Blaulicht.
Dargestellt sind mit dem Computer nach dem Verlauf der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten berechnete Werte (....) und gemessene Enzymaktivitäten (o: Dauerrotlicht, X: Dauerblaulicht, +: Blaulicht nach Rotlichtvorbehandlung).
Auf der Ordinate sind relative Enzymaktivitäten aufgetragen, die sich auf den 21. Tag Rotlicht mit dem Wert 1 bezieht.

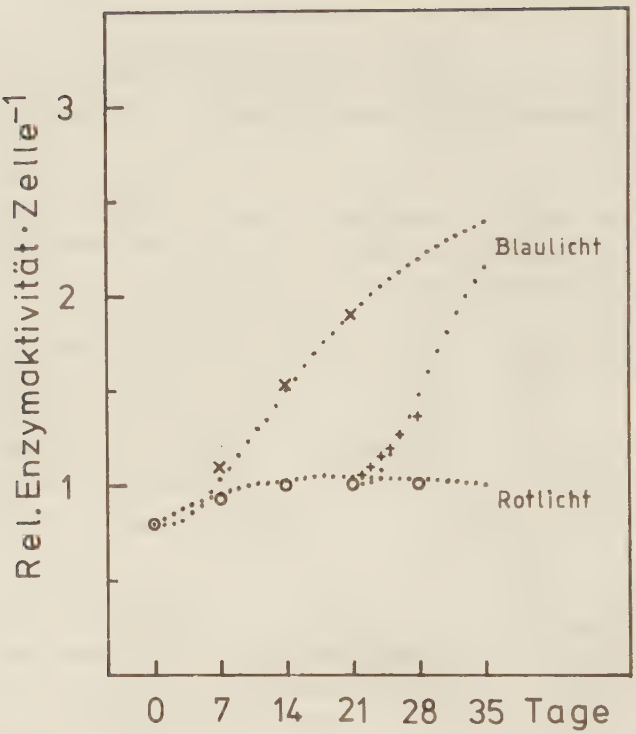

Abb. 19

Vergleich von Modellrechnungen mit experimentell bestimmten Aktivitäten der Hydroxypyruvat-Reductase im Rot- und Blaulicht.

Dargestellt sind mit dem Computer nach dem Verlauf der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten berechnete Werte (....) und gemessene Enzymaktivitäten (o: Dauerrotlicht, X: Dauerblaulicht,+: Blaulicht nach Rotlichtvorbehandlung).

Auf der Ordinate sind relative Enzymaktivitäten aufgetragen, die sich auf den 21. Tag Rotlicht mit dem Wert 1 bezieht.

Die lag-Phasen (Aktivitätsabfall) der berechneten Enzymaktivitäten am Anfang von Dauerblaulicht und Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung sind darauf zurückzuführen, daß die Änderungen der Halbwertszeiten vereinfachend als sprunghaft angenommen wurden.

berechneten.
Im Falle von Übereinstimmung der Modellrechnung mit den Meßwerten ist es wahrscheinlich, daß die Enzymgehalte durch die cytosolischen Proteinsyntheseraten bestimmt sind.

4.1.2. Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung

Aus den Abbildungen 18 und 19 ist zu entnehmen, daß im Dauerrotlicht beide Enzyme den durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten folgen. Mit der Syntheseratenfaktorfunktion (Gl.3) und den oben ermittelten ksO-Werten konnten somit die Geschwindigkeitskonstanten nach 21 Tagen Rotlicht (ks21) berechnet werden (ks21=ks`O=ksO*f1(21)). Mit Hilfe von Gleichung 9` konnten daraufhin die Enzymgehalte entsprechend wie oben veranschlagt werden.
Für die UDPG-Pyrophosphorylase liegen die kalkulierten Aktivitäten im betrachteten Zeitintervall sehr viel niedriger als die experimentell ermittelten (Abb. 18), während bei der Hydroxypyruvat-Reductase eine gute Übereinstimmung beider Aktivitäten beobachtet wird (Abb. 19).

4.1.3. Blaulichtpuls kurzer Dauer

Durch Einsetzen des entsprechenden ks21-Wertes in Gleichung 10 wurden die Enzymaktivitäten der UDPG-Pyrophosphorylase nach einem 2minütigen Blaulichtpuls berechnet. Hierbei lagen wiederum die durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten zugrunde.
Diese Aktivitäten wurden allerdings mit experimentell bestimmten verglichen, die sich nach einem 5minütigen Blaulichtpuls ergaben (Abb.20). Näherungsweise erscheint dies insofern berechtigt, als die erste Phase der Abhängigkeit der Enzymaktivitätssteigerung von der Blaulichtmenge (Abb. 5) bereits mit einer 1,5minütigen Bestrahlung gesättigt ist. Die Werte im verglichenen Zeitintervall liegen innerhalb der zweiten, nur langsam ansteigenden Phase. Somit dürfte der

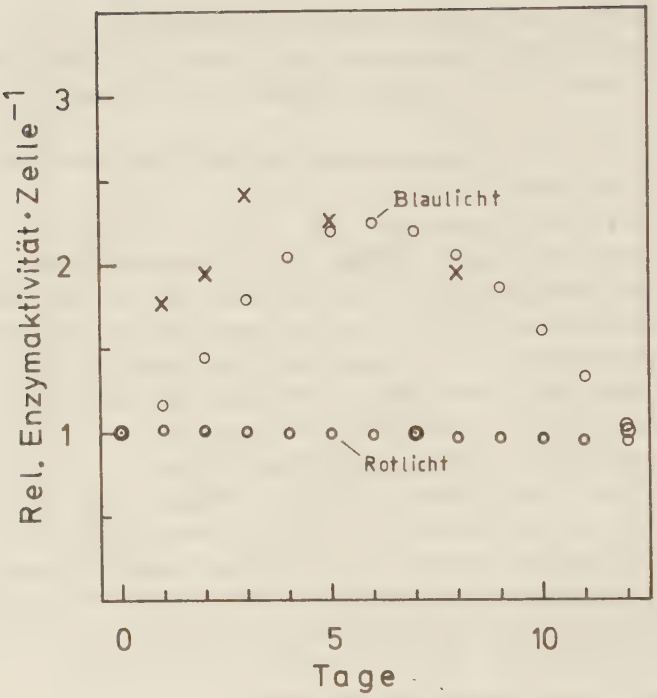

Abb. 20
Modellrechnung für die Steigerung der UDPG-Pyrophosphorylase-Aktivität durch einen kurzen Blaulichtpuls und Vergleich mit experimentell bestimmten Enzymaktivitäten.
x : Enzymaktivität nach Blaulichtpuls von 5 Minuten
o : berechnete Enzymaktivität
o : Enzymaktivität der Rotlichtkontrolle
Die Messwerte entsprechen denen in Abbildung 4a.
Der Modellrechnung liegen Bestimmungen der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten nach einem Blaulichtpuls von 2 Minuten zugrunde.
Auf der Ordinate ist die relative Enzymaktivität dargestellt, die sich auf den 21. Tag Rotlicht mit dem Wert 1 bezieht.

mögliche Fehler gering sein.

Die mit dem Computer berechneten Enzymaktivitäten, die auf den durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten basieren, liegen in den ersten Tagen nach dem Blaulichtpuls deutlich unter denen, die experimentell gemessen wurden.

4.2. Computersimulierte Zuwachsraten der UDPG-Pyrophosphorylase und der Hydroxypyruvat-Reductase während Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung

Die simulierten Zuwachsraten der UDPG-Pyrophosphorylase steigen sehr rasch auf ein hohes Niveau. Dagegen vergrößern sich die der Hydroxypyruvat-Reductase nur langsam und folgen damit dem Verlauf der Änderung der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten (Abb. 21).

4.3. Computersimulierte Zuwachsraten der UDPG-Pyrophosphorylase und der Hydroxypyruvat-Reductase im Dauerrot- und Dauerblaulicht

Im Dauerrotlicht waren die mit Hilfe des Computers jeweils frei berechneten C1-Werte der Syntheseratenfaktorfunktion (Gl. 3), berechnet aus Meßdaten, für beide Enzyme nahezu identisch. Diese, eingesetzt in Gleichung 3, repräsentieren sehr genau den Verlauf der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten. Deshalb ließen sich nicht alle Funktionswerte auf einer gemeinsamen graphischen Darstellung getrennt auftragen (Abb. 22).
Im Dauerblaulicht wurden für die UDPG-Pyrophosphorylase zu den Zeitpunkten 14, 21 und 28 Tage identische Anfangsgeschwindigkeitskonstannten (ksO-Werte für den Tag 0) errechnet, die mit dem ksO-Wert der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten gut übereinstimmen. Dagegen sind die Parameter C1 und C2 der Faktorfunktionsgleichung 4

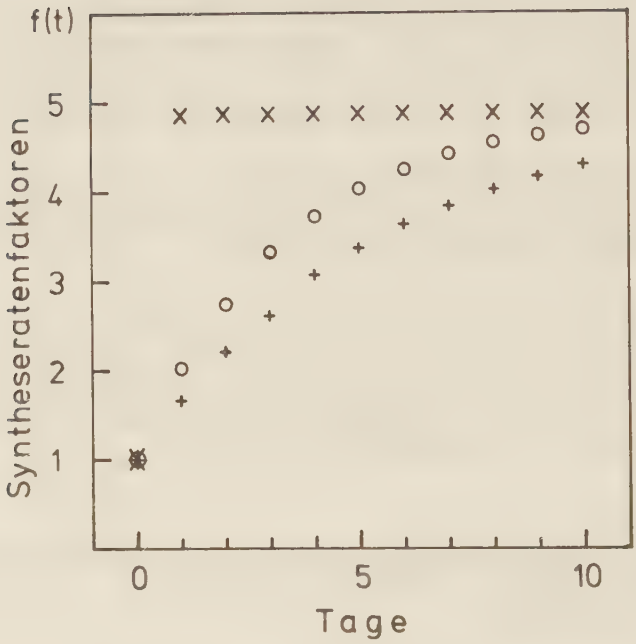

Abb.21

Verlauf computersimulierter Zuwachsraten im Enzymgehalt (UDPG-Pyrophosphorylase und Hydroxypyruvat-Reductase) im Vergleich zu den durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten während Blaulichtbestrahlung nach 3 Wochen Rotlichtvorbehandlung.

+: Verlauf der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten

o: computersimulierte Zuwachsraten für die Hydroxypyruvat-Reductase aus gemessenen Enzymaktivitäten.

X: computersimulierte Zuwachsraten für die UDPG-Pyrophosphorylase aus gemessenen Enzymaktivitäten.

Die Ordinate stellt die Steigerung der Zuwachs- bzw. Syntheseraten (S(t)=kso*f(t)) als n-fache Erhöhung bezogen auf den Tag 0 (n=1) dar.

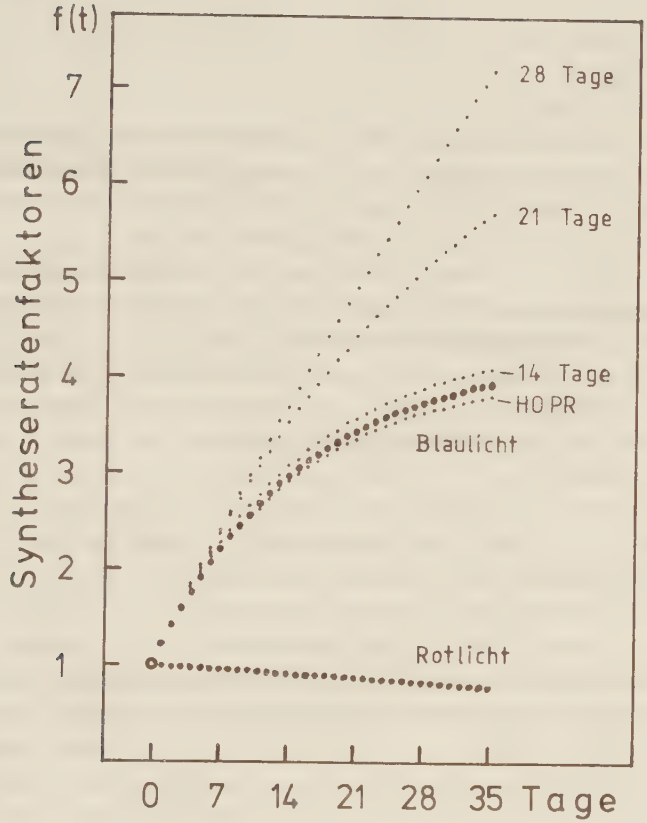
f(t)
Syntheseratenfaktoren
7
6
5
4
3
2
1
28 Tage
21 Tage
14 Tage
HO PR
Blaulicht
Rotlicht
0
7
14
21
28
35 Tage

Abb. 22

Abb. 22
Verlauf computersimulierter Zuwachsraten im Enzymgehalt (UDPG-Pyrophosphorylase und Hydroxypyruvat-Reductase) im Vergleich zu den durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten im Dauerrot- und Dauerblaulicht.
•••• durchschnittliche cytosolische Proteinsyntheseraten
.... computersimulierte Zuwachsraten (Hydroxypyruvat-Reductase mit HO PR besonders vermerkt)
Für die Berechnung der Zuwachsraten wurden verschiedene Zeiträume herangezogen (14, 21 und 28 Tage). Dabei ergaben sich nur für die UDPG-Pyrophosphorylase im Dauerblaulicht Unterschiede.
Im Dauerrotlicht waren die berechneten Zuwachsraten beider Enzyme mit denen der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten nahezu identisch, so daß sie nicht getrennt eingezeichnet werden konnten.
Die Ordinate stellt die Steigerung der Zuwachs- bzw. Syntheseraten (S(t)=kso*f(t)) als n-fache Erhöhung bezogen auf den Tag 0 (n=1) dar.

(Dauerblaulicht) zu den verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich. Es ergeben sich daher abweichende Syntheseraten-faktorfunktionen.

Aus diesen veränderten Faktorfunktionsgleichungen können mit der den Verlauf der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten repräsentierenden Faktorfunktionsgleichung (f2(t)) Quotientenfunktionen (Qi(t) = f2i(t)/f2(t)) gebildet werden. Die Funktionswerte (Quotienten) dieser Funktionen wachsen streng monoton und sind stets >1, wenn sie über den Versuchszeitraum von 35 Tagen betrachtet werden (Tab.4; Abb. 22).

Tabelle 4
Quotientenfunktionen der Syntheseratensteigerung nach 35 Tagen Blaulicht auf der Basis von Enzymmessungen im Zeitraum von 14, 21 und 28 Tagen

Qi(t)	0. Tag (t=0)	35. Tag (t=35)
i=14	1	1,04
i=21	1	1,45
i=28	1	1,83

Die aus den Enzymaktivitäten der Hydroxypyruvat-Reductase im Dauerblaulicht errechneten Parameter C1 und C2, sowie die Anfangsgeschwindigkeitskonstanten (ks0-Werte) stimmen im gesamten Versuchszeitraum mit den entsprechenden Werten, die aus dem Verlauf der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten ermittelt wurden, gut überein. Die graphische Darstellung beider Syntheseratenfaktorfunktionen zeigt einen nahezu identischen Verlauf (Abb.22).

IV Diskussion

Wie in der Einleitung beschrieben, unterscheidet sich die spezifische Aktivität der UDPG-Pyrophosphorylase von Acetabularia mediterranea im Rot- und Blaulicht.
Schon früher konnte gezeigt werden (CLAUSS, 1968; SCHMID und CLAUSS, 1977), daß die Induktion von Wachstum und Morphogenese von Acetabularia mediterranea durch Blaulicht unabhängig vom Zellkern ist.
Eine mögliche Abhängigkeit der UDPG-Pyrophosphorylase im Rot- und Blaulicht von Vorgängen der Transkription war zwar von VETTERMANN (1973) diskutiert worden. Es ergab sich jedoch, daß der Aktivitätsanstieg des Enzyms während Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung nicht im Zellkern kontrolliert wird. (NICKL, 1979).
Es stellt sich dann allerdings die Frage, auf welche Weise die Aktivitätsunterschiede der UDPG-Pyrophosphorylase im Rot- und Blaulicht gesteuert werden. Die Anwesenheit von Enzymaktivatoren oder Inhibitoren ist unwahrscheinlich, da sich in Mischungen von Rohextrakten aus Rot- und Blaulichtzellen die Enzymaktivitäten addieren (Abb. 6). Denn nach SCHOPFER (1972) scheidet eine direkte Hemmung oder Aktivierung eines Enzyms aus, wenn sich seine Aktivitäten in Mischungen zweier Extrakte des Organismus aus unterschiedlichen physiologischen Zuständen additiv verhalten.
Andere Möglichkeiten posttranslationaler Kontrolle sind damit jedoch nicht ausgeschlossen. Diese sind aber aufgrund der Daten aus den Dichtemarkierungexperimenten unwahrscheinlich (s.u.).

Cycloheximid hemmt die Proteinsynthese an 80S - Ribosomen (SIEGEL und SISLER, 1963). Ob Vorgänge der cytosolischen

Translation an der Kontrolle der Enzymaktivität beteiligt sind, kann daher durch den Einsatz von Cycloheximid überprüft werden.
Die hemmende Wirkung von Cycloheximid bei Acetabularia mediterranea ist mehrfach gezeigt worden (ZETSCHE, 1968, 1969; APEL und SCHWEIGER, 1973; KLOPPSTECH und SCHWEIGER, 1974). ZETSCHE (1968) erreichte durch Zugabe von Cycloheximid ins Kulturmedium kurz vor dem Beginn der Hutbildung bei Acetabularia mediterranea eine vollständige Verhinderung des zu diesem Zeitpunkt einsetzenden spezifischen Aktivitätsanstiegs der UDPG-Pyrophosphorylase. Stielwachstum und Hutbildung wurden dabei ebenfalls blockiert.
Eine Konzentration von 0,25 bis 0,5 µg/ml wurde bei den Experimenten mit Acetabularia als voll wirksam beschrieben. Auch im Falle der UDPG-Pyrophosphorylase-Aktivitätssteigerung durch Blaulicht ergibt sich eine vollständige Hemmung nach Zugabe von 0,5 µg/ml Cycloheximid ins Kulturmedium (Abb. 7). Die Blockierung des Aktivitätsanstiegs ist reversibel und daher durch Auswaschen des Hemmstoffs aufhebbar (Abb. 8). Die anschließende Steigung des Anstiegs der Enzymaktivität entspricht dabei der unbehandelten Kontrolle. Dies spricht dafür, daß während der Induktion keine irreversiblen Schädigungen auftreten.
Erst bei höheren Cycloheximid-Konzentrationen treten unspezifische Hemmwirkungen auf (siehe z.B. WENDELBERGER-SCHIEWEG, 1977; WENDELBERGER-SCHIEWEG et al., 1980).

Chloramphenicol inhibiert spezifisch die Proteinsynthese an 70S Ribosomen (ELLIS, 1969). Auch bei Acetabularia mediterranea reduziert Chloramphenicol an den 70S Ribosomen den Einbau von Aminosäuren in Protein (GOFFEAU und BRACHET, 1965; APEL und SCHWEIGER, 1973; KLOPPSTECH und SCHWEIGER, 1974).
ZETSCHE et al. (1970) wiesen nach, daß Chloramphenicol die Synthese der UDPG-Pyrophosphorylase nicht beeinflußt und Vorgänge der Translation an den 70S Ribosomen die Enzymakti-

vität nicht steuern.
Konzentrationen, wie sie die obengenannten Autoren bei ihren Experimenten verwendet haben, wurden auch in den Experimenten dieser Arbeit eingesetzt. Die Anwesenheit von Chloramphenicol schränkt dabei die Steigerung der UDPG-Pyrophosphorylase-Aktivität durch Blaulicht nicht ein (Abb. 9). Daher kann eine Beteiligung des Translationsapparates der Organellen an der Blaulichtkontrolle des Enzyms ausgeschlossen werden. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Dichtemarkierungsexperimenten konnte Chloramphenicol somit auch eingesetzt werden, um Bakterien- und Pilzwachstum während der Inkubation der Algen mit deuterierten Aminosäuren zu verhindern.
Die oben angeführten Befunde legen eine Steuerung der UDPG-Pyrophosphorylase-Aktivität auf der Ebene der cytosolischen Translation nahe. Ob das Enzym aber während der Aktivitätssteigerung durch Blaulicht de novo synthetisiert wird, kann, wie auch anderweitig diskutiert wird (YAGIL et al., 1974; HIZI und YAGIL, 1974; WENDELBERGER-SCHIEWEG, 1977; WENDELBERGER-SCHIEWEG et al., 1980), allein durch den Einsatz von Cycloheximid nicht entschieden werden. Eine de novo Synthese muß somit direkt nachgewiesen werden. Hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode der Dichtemarkierung gewählt.
Die Dichtemarkierung zum Nachweis von Neusynthesen wurde erstmals für Nucleinsäuren angewendet (MESELSON et al., 1957; MESELSON und STAHL, 1958). Später wurde sie auch für Proteine weiterentwickelt (HU et al., 1962; HÜTTERMANN et al., 1971; HÜTTERMANN, 1972; WENDELBERGER und HÜTTERMANN, 1975; HÜTTERMANN und WENDELBERGER, 1976).
Der Nachweis der Dichtemarkierung erfolgt durch Trennung von unmarkierten Molekülen nach isopyknischer Zentrifugation. Ursprünglich wurde CsCl zur Herstellung des Dichtegradienten verwendet. Bei Verwendung von $RbCl/D_2O$ anstelle von $CsCl/H_2O$ erreicht man bei gegebener Zentrifugationsgeschwindigkeit flachere Gradienten. Dadurch wird eine verbesserte Trennung

von Proteinen unterschiedlicher Dichte erreicht. Außerdem kann wegen der hohen Dichte von D_2O mit geringeren Salzkonzentrationen gearbeitet werden (WENDELBERGER-SCHIEWEG, 1977).

In dieser Arbeit wurde mit deuterierten Aminosäuren markiert. Sie sind dafür besonders geeignet, da sie ohne metabolische Veränderungen durch den Primärstoffwechsel in Proteine eingebaut werden können (WENDELBERGER und HÜTTERMANN, 1975; HÜTTERMANN und WENDELBERGER, 1976). Der hohe Deuterierungsgrad der Aminosäuren ergibt dabei einen relativ hohen Markierungsgrad und damit eine gute Voraussetzung für die Trennung in markierte und unmarkierte Proteinanteile.

Deuterierte Aminosäuren zur Dichtemarkierung von Proteinen haben jedoch den Nachteil, daß sie als Substrat für Kontaminanten in den Kulturmedien dienen. Deshalb kann auf die gleichzeitige Anwesenheit von Antibiotica nicht verzichtet werden, wenn, wie in den vorliegenden Experimenten, nicht mit axenischen Kulturen gearbeitet wird. Jedoch genügen hier 5 µg/ml Chloramphenicol, das auch in 10facher Konzentration keine Auswirkungen auf die UDPG-Pyrophosphorylase-Aktivität hat, um Bakterien- und Pilzwachstum zu verhindern.

Ferner muß bei Verwendung deuterierter Aminosäuren ausgeschlossen sein, daß sie zusätzlich unspezifische aktivierende oder hemmende Einflüsse ausüben (WENDELBERGER und HÜTTERMANN, 1975).

In dieser Arbeit entspricht das Verhalten der Enzymaktivitäten in den Dichtemarkierungsexperimenten weitgehend dem bei Abwesenheit von deuterierten Aminosäuren im Kulturmedium unter gleichen Lichtverhältnissen. Ein aktivierender oder hemmender Einfluß durch das Angebot externer Aminosäuren ist demnach unwahrscheinlich.

(Es traten jedoch im Blaulicht an einer Anzahl von Zellen sichtbare Schädigungen auf. Solche Zellen wurden für die Experimente nicht verwendet. Die Schädigungen dürften die Ursache dafür sein, daß die Enzymaktivitäten im Blaulicht pro Zelle etwas niedriger lagen als bei Experimenten ohne

Zusatz deuterierter Aminosäuren. Es ist noch unklar, wodurch diese Schädigungen hervorgerufen werden.)
Eine auf Neusynthese beruhende spezifische Aktivitätszunahme von Enzymen unter induzierenden Bedingungen läßt sich nur dann sicherstellen, wenn sich entsprechende Änderungen nicht auch an solchen Enzymen zeigen, für die eine selektive Aktivitätszunahme nicht nachgewiesen werden konnte. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Aktivität der UDPG-Pyrophosphorylase mit der der Hydroxypyruvat-Reductase verglichen.
Die auf Zelle bezogene Aktivität der Hydroxypyruvat-Reductase steigt im Blaulicht nach Rotlichtvorbehandlung leicht an (Abb. 10), die auf Protein bezogene Aktivität ändert sich dabei jedoch nicht (Abb. 11). Damit folgt die Aktivität dieses Enzyms dem allgemeinen Anstieg des Proteingehalts, und die spezifische Aktivität ist nicht durch Blaulicht reguliert.

Das Ergebnis der Dichtegradientenzentrifugation belegt die Zunahme des Einbaus von Aminosäuren sowohl bei der UDPG-Pyrophosphorylase als auch bei der Hydroxypyruvat-Reductase im Blaulicht (Abb. 13). Der durch Blaulicht geförderte Aktivitätsanstieg im markierten Proteinanteil entspricht dabei einer Zunahme in der Größenordnung, wie sie auch für die durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten unter gleichen Bedingungen beobachtet wird (SCHMID, 1984; siehe auch Kap. II 2.8.3.).
Ein mit der Dichtemarkierung ganzer Zellen vergleichbares Resultat erhält man auch an kernlosen Zellteilstücken (Abb. 14). Während Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung wird ebenfalls der dichtemarkierte Anteil beider Enzyme stark erhöht. Vom Zellkern abhängige Vorgänge, die während der dreitägigen Markierungsdauer den Syntheseverlauf beeinflussen könnten, sind deshalb nicht zu erwarten.
Der jeweilige Aktivitätsanteil des markierten Enzyms im Blaulicht ist, verglichen mit dem im Rotlicht, bei diesen

Experimenten besonders hoch. Dies ist auf eine schwache Markierung der Rotlichtkontrolle zurückzuführen und dürfte damit die Folge einer auffälligen Umkehrung der Empfindlichkeit kernloser Zellteilstücke gegenüber den deuterierten Aminosäuren im Kulturmedium sein. Die kernlosen Zellteilstücke wiesen nämlich im Gegensatz zu den kernhaltigen Zellen hauptsächlich im Rotlicht erhebliche Schädigungen auf. Eine Erklärung für dieses Verhalten ist zur Zeit noch nicht möglich.
Sowohl bei den kernhaltigen Zellen als auch bei den kernlosen Zellteilstücken entspricht aber die Zunahme der Gesamtaktivitäten von UDPG-Pyrophosphorylase und Hydroxypyruvat-Reductase der Vergrößerung des jeweiligen markierten Anteils. Der Gesamtzuwachs an Enzymaktivität/Zelle ist damit allein durch Neusynthese erklärbar (vgl. Kap. III 2.4.). Die Enzymaktivität dürfte demnach ein repräsentatives Maß für die Enzymmenge sein.
Eine selektive Aktivitätssteigerung der UDPG-Pyrophosphorylase kann hingegen durch einen direkten Vergleich der Dichtemarkierung beider Enzyme nicht belegt werden.

Der jeweils aktuelle Gehalt eines Enzyms in vivo wird neben der Synthese auch durch den Abbau bestimmt. In der Regel folgt die Destruktion eines Enzyms einer Kinetik 1.Ordnung (BERLIN und SCHIMKE, 1965; SCHIMKE und DOYLE, 1970; PRICE und STEVENS, 1982). Dies ist auch bei der UDPG-Pyrophosphorylase und der Hydroxypyruvat-Reductase von Acetabularia mediterranea der Fall (Abb. 17).
Die Halbwertszeiten des Abbaus der UDPG-Pyrophosphorylase sind verhältnismäßig kurz und im Rot- und Blaulicht gleich. Für die Hydroxypyruvat-Reductase, die insgesamt langsamer abgebaut wird, ergibt sich dagegen eine deutliche Verkürzung der Halbwertszeit durch Blaulicht. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß durch die erhöhte Translationsaktivität im Blaulicht vermehrt proteolytische Enzyme entstehen, die rückkoppelnd die Proteindestruktion beschleunigen. Es

ist deshalb an dieser Stelle besonders hervorzuheben, daß das Blaulicht nicht nur die Synthese der Enzyme steuert, sondern ihren Gehalt auch über die Destruktion differentiell beeinflußt.
Die Hydroxypyruvat-Reductase ist ein Markerenzym für Peroxisomen (TOLBERT et al., 1970), und es wäre denkbar, daß sich lichtabhängig das peroxisomale Kompartiment der Zelle qualitativ oder quantitativ verändert. Diese Überlegung soll jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht vertieft und weitergeführt werden.

Der im Vergleich zur Hydroxypyruvat-Reductase rasche Abbau der UDPG-Pyrophosphorylase wird im Gleichgewicht durch eine entsprechend schnelle Syntheserate ausgeglichen. Diese ist auch im Rotlicht wesentlich größer als die der Hydroxypyruvat-Reductase (Abb. 16a und b). Der unterschiedliche turnover zwischen den beiden Enzymen und die lichtabhängigen Destruktionskonstanten der Hydroxypyruvat-Reductase lassen erwarten, daß sich die relativen Gehalte der beiden Enzyme verschieben, wenn sich die Gesamtsyntheseraten ändern. Wie schon erwähnt, ist dies für die durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten beim Umschalten auf die andere Lichtqualität der Fall.
Das Ausmaß solcher Verschiebungen läßt sich über Modellrechnungen ermitteln. Die Enzymgehalte ergeben sich dabei aus den durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten und den Halbwertszeiten der Enzyme. Umgekehrt lassen sich die Zuwachsraten (bzw. Syntheseraten) der Enzyme aus ihren Aktivitäten (bzw. Gehalten) und ihren Halbwertszeiten berechnen.

Der aus den Modellrechnungen folgende Gehalt der Hydroxypyruvat-Reductase deckt sich für alle Lichtbedingungen sehr gut mit den experimentell bestimmten Aktivitäten (Abb. 19). Zudem folgen die berechneten Zuwachsraten der Hydroxypyruvat-Reductase fast ohne Abweichung den durchschnittlichen

Syntheseraten der cytosolischen Proteine (Abb. 21 und 22). Der Enzymgehalt läßt sich in diesem Fall vollständig durch die quantitativen Änderungen der cytosolischen Translation und den Halbwertszeiten des Enzymabbaus erklären.
Da sich sowohl der Gehalt als auch die Zuwachsraten der Hydroxypyruvat-Reductase in Übereinstimmung mit dem Gehalt und den durchschnittlichen Syntheseraten aller cytosolischer Proteine befindet, ist es vorstellbar, daß auch bei den übrigen cytosolischen Proteinen eine blaulichtabhängige Beschleunigung des Abbaus eintritt. Dies bleibt experimentell zu überprüfen.

Bei der UDPG-Pyrophosphorylase ergibt sich eine entsprechende Übereinstimmung zwischen berechneten und experimentell bestimmten Werten nur im Dauerrotlicht. Im Dauerblaulicht ist zwar während der ersten 14 Tage ebenfalls eine Übereinstimmung zwischen berechneten und gemessenen Werten zu beobachten, die Werte der gemessenen Enzymaktivitäten liegen jedoch nach längerer Blaulichtbestrahlung sowie für Blaulicht nach Rotlichtvorbehandlung wesentlich höher als die nach der Modellrechnung zu erwartenden Werte (Abb. 18). Dies beruht darauf, daß hier die Zuwachsraten der UDPG-Pyrophosphorylase in einem sehr viel stärkeren Maße als die durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten steigen (Abb. 21 und 22). Darüber hinaus weicht die Kinetik der Enzymzuwachsraten bei der UDPG-Pyrophosphorylase im Blaulicht nach Rotlichtvorbehandlung stark von derjenigen der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten ab (Abb. 21). Der Anstieg der UDPG-Pyrophosphorylase-Aktivität läßt sich in diesem Fall allein durch eine fast sprunghafte Erhöhung der spezifischen Zuwachsraten erklären.
Dieser Vorgang ist nur als eine selektive Kontrolle der Enzymsynthese im Bereich der Translation interpretierbar. Durch Blaulicht werden demnach Translationsvorgänge nicht nur allgemein aktiviert, sondern es werden zusätzlich differentielle Steuerungsmechanismen wirksam.

Die selektive Zuwachsratensteigerung der UDPG-Pyrophosphorylase nach 14 Tagen Dauerblaulicht könnte mit dem Beginn der zu dieser Zeit zu beobachtenden Hutbildung im Zusammenhang stehen. Wie in der Einleitung schon dargestellt wurde, ist ein Anstieg der spezifischen Aktivität der UDPG-Pyrophosphorylase zu diesem Zeitpunkt beschrieben worden (ZETSCHE, 1968; GRIENINGER, 1970).

Ein weiterer Hinweis auf selektive Translationskontrolle bei der UDPG-Pyrophosphorylase von Acetabularia mediterranea ergibt sich aus der Fluenz-Effektkurve (Abb. 5). Die Abhängigkeit des Aktivitätsanstiegs der UDPG-Pyrophosphorylase von der Dauer des induzierenden Blaulichts läßt sich als zweiphasig interpretieren. Eine erste Phase zeigt eine sehr rasche Sättigung mit bereits ca. 100 Sekunden Blaulicht (4,8 W/m^2). Darüber steigt die Zunahme der Enzymaktivität mit der Dauer des Blaulichts nur langsam an.
Auch im Bereich unter 100 Sekunden Blaulicht beruht die Zunahme der UDPG-Pyrophosphorylase-Aktivität auf Neusynthese (Abb. 15). Für die Hydroxypyruvat-Reductase als Referenz-Enzym war nicht in jedem Fall eine Aktivitätszunahme festzustellen. Dieser Umstand deutet darauf hin, daß die UDPG-Pyrophosphorylase unabhängig von der Translation anderer Proteine induziert werden kann.

Es ist gezeigt worden, daß eine zweiminütige Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung zu einer vorübergehenden Steigerung der cytosolischen Translation führt (SCHMID, unveröffentlicht). Eine selektive Translationskontrolle der UDPG-Pyrophosphorylase ist demnach als Überlagerung einer allgemeinen Förderung der cytosolischen Translationsaktivität durch Blaulicht vorstellbar. Dies trifft auf jeden Fall für Dauerblaulicht nach Rotlichtvorbehandlung zu (Abb. 18 und 21), dürfte aber auch für kurze Blaulichtpulse nach Rotlichtvorbehandlung gelten (Abb. 20). Hier liegen wie bei

Dauerblaulicht die experimentell bestimmten Werte über den berechneten. Auch das Ausmaß der Abweichung entspricht dem bei Dauerblaulicht.
Die Fluenz-Effektkurve der UDPG-Pyrophosphorylase könnte daher als zusammengesetzt gedeutet werden,

- aus einer Phase hoher Sensitivität gegenüber Blaulicht, in der der Aktivitätsanstieg selektiv gesteuert wird und
- aus einer Phase geringer Sensitivität, in der sich die Zunahme der Aktivität aus einer Verschiebung der Proteinzusammensetzung durch Förderung der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten und des allgemeinen Protein-turnover ergibt.

Die Hydroxypyruvat-Reductase verhält sich dagegen in ihrer Abhängigkeit vom Blaulicht wie der Durchschnitt aller anderen Proteine. Denn ihre spezifische Aktivität ist weder durch Blaulicht (Abb. 11) noch durch kurzzeitige Blaulichtgaben (Abb. 12) zu beeinflussen.

Zusammenfassend lassen sich die Vorgänge, die für die quantativen Veränderungen im Proteinmuster bei Acetabularia mediterranea im Rot- und Blaulicht verantwortlich sind, folgendermaßen interpretieren:

- Blaulicht fördert generell die Raten der cytosolischen Translation. Hier muß man davon ausgehen, daß im Rotlicht mRNA akkumuliert und dann in gespeicherter Form im Cytosol vorliegt. Dies dürfte die Ursache dafür sein, daß im Blaulicht nach Rotlichtvorbehandlung der Anstieg der cytosolischen Translation (Abb. 21 und 22) sowie die Aktivitätszunahme der UDPG-Pyrophosphorylase (Abb. 1), verglichen mit dem Anstieg im Dauerblaulicht, erheblich steiler verläuft.

Die Vorstellung von einem aktuell nicht translatierten mRNA-Speicher ist bei Acetabularia nicht unüblich. Die morphogenetische Kapazität kernloser Zellteilstücke führt HÄMMERLING

(1934, 1963) auf die Anwesenheit gespeicherter "morphogenetischer Substanzen" zurück. Auf die inzwischen allgemein akzeptierte, aber nicht endgültig bewiesene Identität von mRNA und "morphogenetischer Substanzen" (KLOPPSTECH und SCHWEIGER, 1975, 1976; SCHWEIGER und BERGER, 1979; SHOEMAN und SCHWEIGER, 1982) muß hierbei hingewiesen werden.
Unter Bedingungen, bei denen die Translation der Zellen blockiert ist, kommt es zu einer Anreicherung von "artspezifischen (die jeweilige Art spezifisch ausprägenden) und nichtartspezifischen (der Funktion des allgemeinen Stoffwechsels dienenden) morphogenetischen Substanzen" (ZETSCHE, 1965b). Entsprechendes ist auch für verdunkelte Acetabularien beschrieben worden, bei denen keine Netto-Proteinsynthese erfolgt (RICHTER, 1959; WERZ, 1960). Auch bei Dunkelheit werden vom Zellkern "morphogenetische Substanzen" an das Cytoplasma des Stiels abgegeben und akkumulieren dort, bis durch erneute Belichtung die Netto-Proteinsynthese wieder ansteigt (HÄMMERLING und HÄMMERLING, 1959).
Der Abbau der "morphogenetischen Substanzen" im Speicher dürfte nur sehr gering sein (ZETSCHE, 1965b; HÄMMERLING, 1963). Nur so läßt sich ihre Akkumulation verstehen.
Auch unter Rotlichtbedingungen läuft die Produktion von polyadenylierter RNA (mRNA) im Kern und die Abgabe von "morphogenetischen Substanzen" an den Stiel weiter (SCHMID, 1978). Als eine der Wirkungen von Blaulicht wäre deshalb vorstellbar, daß es die "Überführung" von mRNA aus der gespeicherten Form in eine aktive, translatierbare Form fördert. Zur Translation notwendige Komponenten, wie Ribosomen, tRNA etc., sind jedenfalls vorhanden, da auch das kernlose System ohne Einschränkung durch Blaulicht aktivierbar ist.

▶ Wie oben am Beispiel der Hydroxypyruvat-Reductase diskutiert wurde, ist eine allgemeine Förderung des Proteinabbaus durch Blaulicht wahrscheinlich. Wie die Ergebnisse aus den Modellrechnungen belegen, können sowohl die

Förderung der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten als auch, möglicherweise rückgekoppelt, die Veränderungen der Halbwertszeiten des Proteinabbaus bereits zu einer wesentlichen Änderung des Proteinmusters beitragen.

- Zusätzlich zu diesen Änderungen kommt es beim Übergang vom Rot- ins Blaulicht zu einer selektiven Förderung der Synthese einzelner Proteine, wie z.B. der UDPG-Pyrophosphorylase.

- Da im Falle der Hydroxypyruvat-Reductase eine blaulichtabhängige Änderung der Halbwertszeiten des Abbaus gefunden wurde, bei der UDPG-Pyrophosphorylase hingegen nicht, ist daraus zu schließen, daß auch der Abbau selektiv erfolgt. Definierte Proteine sind von der zu erwartenden allgemeinen Steigerung des Abbaus ausgenommen. (Es wäre zusätzlich vorstellbar, daß die Destruktion anderer Enzyme überdurchschnittlich verstärkt wird.)

Die vorliegende Arbeit gibt Belege für eine solche Interpretation der blaulichtabhängigen Steuerung der Proteinzusammensetzung bei Acetabularia mediterranea. Der zugrunde liegende Mechanismus für diese Vorgänge bleibt jedoch unklar und liegt außerhalb der Zielsetzung dieser Arbeit.

V Zusammenfassung

Die spezifische Aktivität der UDPG-Pyrophosphorylase bei Acetabularia mediterranea nimmt während einer dreiwöchigen Rotlichtbestrahlung ab. Wird anschließend mit Blaulicht bestrahlt, steigt sie innerhalb von ca. 3 Tagen um das etwa 2,5 bis 3,5fache der Rotlichtkontrolle an.

Auch bei kernlosen Zellteilstücken kann dieser Anstieg beobachtet werden.

Cycloheximid verhindert den Anstieg der spezifischen Aktivität der UDPG-Pyrophosphorylase bei einsetzender Blaulichtbestrahlung, durch Chloramphenicol wird ein solcher Anstieg dagegen nicht beeinflußt.

Dichtemarkierung zeigt, daß die Synthese der UDPG-Pyrophosphorylase während des Aktivitätsanstiegs drastisch erhöht ist. In einem ähnlichen Ausmaß sind allerdings auch die Raten der durchschnittlichen cytosolischen Proteinsynthese ebenfalls erhöht.

Bei einem Kontroll-Enzym, der Hydroxypyruvat-Reductase, dessen spezifische Aktivität unabhängig vom Blaulicht ist, kann ein gleicher Anstieg der Synthese festgestellt werden.

Computergestützte Analysen der Aktivitätsprofile von UDPG-Pyrophosphorylase und Hydroxypyruvat-Reductase nach der Dichtemarkierung und anschließender isopyknischer Zentrifugation ermöglichen die Bestimmung der Halbwertszeiten für den jeweiligen Enzymabbau im Rot- und Blaulicht an der unmarkierten Fraktion der Enzyme.

Der Abbau der UDPG-Pyrophosphorylase ist lichtunabhängig, der der Hydroxypyruvat-Reductase ist unter Blaulichtbedingungen beschleunigt.

Modellrechnungen, die sich auf experimentell bestimmte Daten wie die durchschnittlichen cytosolischen Proteinsyntheseraten, die Geschwindigkeitskonstanten des Enzymabbaus von UDPG-Pyrophosphorylase und Hydroxypyruvat-Reductase und die jeweiligen Aktivitäten beider Enzyme stützen, geben schlüssige Hinweise darauf, daß der Aktivitätsanstieg der UDPG-Pyrophosphorylase während Blaulichtbestrahlung nach Rotlichtvorbehandlung aus zwei Komponenten besteht:

- aus einer, die auf eine generelle Förderung der cytosolischen Translation unter diesen Bedingungen zurückzuführen ist
- und einer, die auf einer selektiven Förderung der Translation des Enzyms beruht.

Die Fluenz-Effektkurve für die Steigerung der UDPG-Pyrophosphorylase-Aktivität durch Blaulicht gibt einen weiteren Hinweis auf eine selektive Translationskontrolle der UDPG-Pyrophosphorylase.

Vorgänge, die für die quantitativen Veränderungen im Proteinmuster bei Acetabularia mediterranea im Rot- und Blaulicht verantwortlich sind, werden als zusammengesetzt interpretiert. Sie sind die Folge von

- einer generellen Förderung der cytosolischen Translationsraten,
- einer allgemeinen Förderung des Proteinabbaus,
- einer selektiven Förderung der Synthese einzelner Proteine
- und eines selektiven Proteinabbaus, wobei definierte Proteine von einer möglichen allgemeinen Förderung des Abbaus ausgenommen sind.

VI Literatur

APEL K, SCHWEIGER H-G (1973) Sites of synthesis of Chloroplast-Membrane Proteins. Evidence for Three Types of Ribosomes Engaged in Chloroplast-Protein Synthesis. Eur J Biochem 38:373-383

BERLIN CH M, SCHIMKE R T (1965) Influence of Turnover Rates on the Responses of Enzyme to Cortisone. Mol Pharmacol 1:149-156

BETH K (1953) Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung des Lichts auf die Formbildung von kernhaltigen und kernlosen Acetabularia Zellen. Z. Naturforsch 8b:334-342

BRACHET J (1967) Protein Synthesis in the Absence of the Nucleus. Nature (Lond) 213:650-655

BRACHET J, BONOTTO S eds. (1970) Biology of Acetabularia. Academic Press, London New York

BRACHET J, LANG A (1963) The role of the nucleus and the nucleocytoplasmic interactions in morphogenesis. Handb Pflanzenphysiol 15:1-40

BRADFORD M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254

BÜCHER T, LUH W, PETTE D (1964) Einfache und zusammengesetzte optische Tests mit Pyridinnucleotiden. In: HOPPE-SEYLER und THIERFELDER, Handbuch der physiologischen und pathologisch-chemischen Analyse Bd 61a:295-339 Sringer, Berlin Heidelberg

CLAUSS H (1963) Über den Einfluß von Rot- und Blaulicht auf das Wachstum kernhaltiger Teile von Acetabularia mediterranea Naturwiss 50:719-721

CLAUSS H (1968) Beeinflussung der Morphogenese, Substanzproduktion und Proteinzunahme von Actabularia mediterranea durch sichtbare Strahlung. Protoplasma 65:49-80

CLAUSS H (1972) Der Einfluß von Rot- und Blaulicht auf die Photosynthese von Acetabularia mediterranea und auf die Verteilung des assimilierten Kohlenstoffs. Protoplasma 74:357-379

CLAUSS H (1973) Regulation der Morphogenese von Acetabularia durch Licht. In: Vom Gen zum Genus, Pessedienst Wissenschaft der FU Berlin 3:45-59

CLEGHORN R A, JENDRASSIK L (1934) Photometrische Stickstoffbestimmung. Biochem Z 274:189-193

DILLARD W L, GRAF L, SCHWEIGER H-G (1983) Regulation of UDPG pyrophosphorylase in Acetabularia mediterranea. Eur J Cell Biol 29:145-149

ELLIS R J (1969) Chloroplast ribosomes: Stereospecificity of inhibition by chloramphenicol. Science 163:477-478

FLEMMING S (1979) Entwicklungsgenetische Untersuchungen an Fomes annosus. Untersuchungen über Enzymaktivitäten des Chitinstoffwechsels während der Morphogenese. Dissertation, Göttingen

GAASTRA P (1959) Photosynthesis of crop plants as influenced by light, carbon dioxide, temperature, and stomal diffusion resistance. Meded Landbouwhogesch Wageningen 59:1-68

GOFFEAU A, BRACHET J (1965) Deoxyribonucleic acid-dependent incorporation of amino acids into the proteins of chloroplasts isolated from anucleate Acetabularia fragments. Biochim Biophys Acta 95:302-313

GRIENINGER G E (1970) Regulation der Aktivität von Phosphoglucose-isomerase und Phosphoglucomutase während der Morphogenese kernhaltiger und kernloser Acetabularien. Dissertation, Tübingen

GRIENINGER G E, ZETSCHE K (1972) Die Aktivität von Phosphoglucose-Isomerase und Phosphoglucomutase während der Morphogenese kernhaltiger und kernloser Acetabularien. Planta (Berl) 104:329-351

HÄMMERLING (1931) Entwicklungs- und Formbildungsvermögen von Acetabularia mediterranea. Biol Zentralbl 51:633-647

HÄMMERLING J (1932) Entwicklungs- und Formbildungsvermögen von Acetabularia mediterranea. II Das Formbildungsvermögen kernhaltiger und kernloser Teile. Biol Zentralbl 52: 42-61

HÄMMERLING J (1934) Über formbildende Substanzen bei Acetabularia mediterranea, ihre räumliche und zeitliche Verteilung und ihre Herkunft. Roux` Arch Entwicklungsm Org 131:1-81

HÄMMERLING J (1963) Nucleocytoplasmic interactions in Acetabularia and other cells. Ann Rev Physiol 14:65-92

HÄMMERLING J, CLAUSS H, KECK K, RICHTER G, WERZ G (1958) Growth and proteinsynthesis in nucleated and enucleated cells. Exp Cell Res Suppl 6:210-226

HÄMMERLING J, HÄMMERLING CH (1959) Kernaktivität bei aufge-

hobener Photosynthese. Planta 52:516-527

HIZI A, YAGIL G (1974) On the Mechanism of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Regulation in Mouse Liver. 3. The Rate of Enzyme Synthesis and Degradation. Eur J Biochem 45:211-221

HU A S, BOCK R M, HALVORSON H O (1962) Separation of labeled from unlabeled proteins by equilibrium density gradient sedimentation. Anal Biochem 4:489-504

HÜTTERMANN A (1972) Isoenzyme pattern and de novo synthesis of phosphodiesterase during differentiation (spherulation) in Physarum polycephalum. Arch Microbiol 83:155-164

HÜTTERMANN A, ELSEVIER S M , ESCHRICH W (1971) Evidence for the de novo synthesis of glutamate dehydrogenase during the spherulation of Physarum polycephalum. Arch Microbiol 77:74-85

HÜTTERMANN A, WENDELBERGER G (1976) Density labeling of proteins. In: PRESCOTT D M (ed) Methods in Cell Biology, Vol 13:153-170, Academic Press, London New York

IDZIAK E-M (1980) Steuerung der Wirtelbildung von Acetabularia mediterranea durch sichtbare Strahlung. Wissenschaftliche Hausarbeit, Berlin

IRIKI Y, MIWA T (1960) Chemical Nature of the cell wall of the green algea Codium, Acetabularia and Halicoryne. Nature 185:178-179

JOHNSON C B (1977) The Use of Density Labelling Techniques in Investigation into the Control of Enzyme Levels. In: SMITH H (ed) Regulation of Enzyme Synthesis and Activity in Higher Plants, Academic Press, London New York

KECK K (1964) Culturing and Exprimental Manipulation of Acetabularia. In: PRESCOTT D (ed) Methods in Cell Physiology 1:189-213., Academic Press, London New York

KLOPPSTECH K, SCHWEIGER H-G (1974) The site of synthesis of chloroplast ribosomal proteins. Plant Sci Letters 2:101-105

KLOPPSTECH, SCHWEIGER H-G (1975) Polyadenylated RNA from Acetabularia. Differentiation 4:115-123

KLOPPSTECH K, SCHWEIGER H-G (1976) In vitro translation of poly(A) RNA from Acetabularia. Cytobiol 13:394-400

KLOPPSTECH K, SCHWEIGER H-G (1982) Stability of Poly(A)+ RNA in Nucleate and Anucleate Cells of Acetabularia. Plant Cell Reports 1:165-167

MESELSON M, STAHL F W (1958) The replication of DNA in Escherichia coli. Proc Nat Acad Sci (Wash) 44:671-682

MESELSON M, STAHL F W, VINOGRAD J (1957) Equilibrium Sedimentation of density gradients. Proc Nat Acad Sci (Wash) 43:581-588

MIWA T, IRIKI Y, SUZUKI T (1961) Mannan and xylan as essentiell cell wall constituents of some siphonous green alga. Chimie et physicochimie des principes immediates tires des algues. Coll int Centre nat Rech sci 103:135-143

MOHR H, MEYER U, HARTMANN K (1964) Die Beeinflussung der Farnsporenkeimung (Osmunda cinnamomea (L.) und O.claytoniana(L.)) über das Phytochromsystem und die Photosynthese. Planta 60:483-496

MUNCH-PETERSEN A (1955) Investigations of the properties and

mechanism of the uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase reaction. Acta Chem Scan 9:1523-1536

NICKL B (1979) Der Einfluß von Rot- und Blaulicht auf die Aktivität der UDPG-Pyrophosphorylase von Acetabularia mediterranea. Diplomarbeit, Berlin

PRICE N C, STEVENS L (1982) Fundamentals of Enzymology. Oxford University Press, Oxford New York

PUISEUX-DAO S ed. (1970) Acetabularia and Cell Biology. Logos Press Ltd, London

RICHTER G (1959) Die Auswirkung der Zellkernentfernung auf die Synthese von Ribonucleinsäuren und Cytoplasma-Proteinen bei Acetabularia mediterranea. Biochim Biophys Acta (Amst) 34:407-419

SCHIMKE R T, DOYLE D (1970) Control of Enzyme Levels in Animal Tissues. Ann Rev Biochem 39:929-976

SCHMID R (1978) Zur Frage der Beteiligung des Zellkerns an den blaulichtabhängigen Photomorphosen bei Acetabularia mediterranea. Dissertation, Berlin

SCHMID R (1984) Blue Light Effects on Morphogenesis and Metabolism in Acetabularia. In: SENGER H (ed) Blue Light Effects in Biological Systems. Springer Verlag, Berlin Heidelberg

SCHMID R, CLAUSS H (1974) Die Vermehrung der Chloroplasten von Acetabularia im Rot- und Blaulicht. Protoplasma 82:283-287

SCHMID R, CLAUSS H (1975) Multiplication and proteincontent of Chloroplasts of Acetabularia mediterranea in blue light

after prolonged irradiation with red light. Protoplasma 85:315-325

SCHMID R, CLAUSS H (1977) Is the nucleus involved in the blue light mediated photomorphoses in Acetabularia mediterranea? In: WOODCOCK C L F (ed) Progress in Acetabularia research. Academic Press, London New York

SCHOPFER P (1972) Phytochrome and the control of enzyme activity. In: MITRAKOS K, SHROPSHIRE W (eds) Phytochrome. Academic Press, London New York

SCHWEIGER H-G (1969) Cellbiology of Acetabularia Curr Top Microbiol Immunol 50:1-36

SCHWEIGER H-G (1976) Nucleocytoplasmic interaction in Acetabularia. In: KING R C (ed) Handbook of genetics 5:451-475. Plenum Publishing Corp, New York

SCHWEIGER H-G (1982) Interrelationship Between Chloroplast and the Nucleo-Cytosol Compartment in Acetabularia. In: PARTHIER B , BOULTER D (eds) Encyclopedia of Plant Physiology 14B:645-662. Springer Verlag, Berlin Heidelberg

SCHWEIGER H-G, BANNWARTH H, BERGER S, KLÖPPSTECH K (1975) Acetabularia, a cellular modell for the study of nucleocytoplasmic interactions. Repr. from Molecular Bioloy of Nucleocytoplasmic Relationships. Elsevier Scientific Publishing Comp, Amsterdam

SCHWEIGER H-G, BERGER S (1979) Nucleocytoplasmic interrelationships in Acetabularia and some other Dasycladaceae. Int Rev Cytol Suppl 9:11-44

SCHWEIGER H-G, BERGER S (1981) Pattern Formation in Acetabularia. In: KIERMAYER O (ed) Cell Biology Monographs 8:119-

145. Springer Verlag, Wien New York

SCHWEIGER H-G, DEHM P, BERGER S (1977) Culture Conditions for Acetabularia. In:WOODCOCK C L F (ed) Progress in Acetabularia Research 319-330. Academic Press, London New York

SHOEMAN R L, SCHWEIGER H-G (1982) Gene expression in Acetabularia, II Analysis of in vivo translation products. J Cell Sci 58:35-48

SIEGEL M R, SISLER H D (1963) Inhibition of protein synthesis in vitro by cycloheximide. Nature 200:675-676

TOLBERT N E, YAMAZAKI R K, OESER A (1970) Localisation and properties of hydroxypyruvate and glyoxylate reductases in spinach leaf particles. J Biol Chem 245:5129-5136

VETTERMAN W (1973) Mechanism of the Light-Dependent Accumulation of Starch in Chloroplasts of Acetabularia and Its Regulation. Protoplasma 76:261-278

WALLENFELS K, ZARNITZ M-L, LAULE G, BENDER H, KESER M (1959) Untersuchungen über milchspaltende Enzyme III, Reinigung, Kristallisation und Eigenschaften der β-Galaktosidase von E. coli ML 309. Biochem Z 331:459-485

WENDELBERGER-SCHIEWEG G (1977) Probleme beim Nachweis differentieller Enzymsynthese während der Sklerotienbildung von Physarum polycephalum. Dissertation, Göttingen

WENDELBERGER-SCHIEWEG G, HÜTTERMANN A, HAUGLI F B (1980) Multiple sites of action of cycloheximide in addition to inhibition of protein synthesis in Physarum polycephalum. Arch Microbiol 126:109-115

WENDELBERGER G, HÜTTERMANN A (1975) Dichtemarkierung und

isopyknische Zentrifugation von Proteinen. Beckmann report 1+2:38-46

WERZ G (1960) Über die Wirkung von Dunkelheit auf Proteingehalt kernhaltiger und kernloser Zellteile von Acetabularia mediterranea. Z Naturforsch 156:85-90

WERZ G (1963) Vergleichende Zellmembrananalysen bei verschiedenen Dasycladaceen. Planta 60:322-330

WERZ G (1970) Cytoplasmic Control of Cell Wall Formation in Acetabularia. Curr Topics Microbiol Immunol 51:27-62

WERZ G (1974) Fine-structural aspects of morphogenesis in Acetabularia. Internat Rev Cytology 38:319-367

YAGIL G, SHIMRON F, HIZI A (1974) On the Mechanism of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Regulation in Mouse Liver, 1. Chracterization of the System. Eur J Biochem 45:189-200

ZETSCHE K (1965a) Nachweis von Guano_indiphosphat-Mannose- und Uridindiphosphat-Glucose-Pyrophosphorylase in Acetabularia. Planta 64:129-137

ZETSCHE K (1965b) Anreicherung von morphogenetischen Substanzen in Lichtpflanzen von Acetabularia mediterranea unter dem Einfluß von Puromycin. Planta 64:119-128

ZETSCHE K (1966a) Nachweis von Enzymen des Galactosestoffwechsels in der Grünalge Acetabularia mediterranea. Planta (Berl) 68:240-246

ZETSCHE K (1966b) Regulation der UDP-Glucose-4-Epimerase Synthese in kernhaltigen und kernlosen Acetabularien. Biochim Biophys Acta 124:332-338

ZETSCHE K (1967) Unterschiedliche Zusammensetzung von Stiel- und Hutzellwand bei Acetabularia mediterranea. Planta (Berl) 76:326-334

ZETSCHE K (1968) Regulation der UDPG-Pyrophosphorylase Aktivität in Acetabularia, I Morphogenese und UDPG-Pyrophosphorylase Synthese in kernhaltigen und kernlosen Zellen. Z Naturforsch 23:369-376

ZETSCHE K (1969) Die Wirkung von RNA- und Proteinsyntheseinhibitoren auf den Chlorophyllgehalt kernhaltiger und kernloser Acetabularien. Planta (Berl) 89:284-298

ZETSCHE K, GRIENINGER G E, ANDERS J (1970) Regulation of enzyme activity during morphogenesis of nucleate and anucleate cells of Acetabularia. In: BRACHET J, BONOTTO S (eds) Biology of Acetabularia. Academic Press, London New York

Herrn Dr. R. Schmid danke ich für hilfreiche Diskussionen während der Anfertigung des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. C. Schnarrenberger danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Mein besonderer Dank gilt Herrn B. Söllner, der mit großem Interesse die Ausarbeitung der Methoden zur mathematischen Auswertung der Ergebnisse unterstützte.

Lebenslauf

20.4.1950	Geburt als erstes von drei Kindern des Musikers Franz Nickl und seiner Ehefrau Margarete, geb. Knappek in Berlin-Wilmersdorf
April 1957 - März 1960	Barnim Schule (Grundschule) in Berlin-Schöneberg
April 1960 - März 1961	St. Marienschule in Berlin-Neukölln
April 1961- Januar 1971	Canisius-Kolleg in Berlin-Tiergarten
	Abschluß: Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife
1971	Beginn des Studiums der Biologie und Chemie an der Freien Universität Berlin
1976-1979	Studentischer Tutor am Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie der Freien Universität Berlin
1976	Vorprüfung zur Diplomprüfung im Fach Biologie
Mai 1977	Allgemeine Prüfung - Abschnitt I der Ersten (Wissenschaftlichen) Staatsprüfung für das Amt des Studienrats
Februar 1979	Erste (Wissenschaftliche) Staatsprüfung für das Amt des Studienrats in den Fächern Biologie und Chemie

Juni 1979	Einstellung als Lehrer mit einem Stundenvertrag am Arndt-Gymnasium in Berlin-Dahlem
Juli 1979	Diplom-Prüfung im Fach Biologie
November 1979	Ernennung zum Studienreferendar
Mai 1980	genehmigte Unterbrechung der Referendarausbildung und Beginn der experimentellen Arbeit zu vorliegender Dissertation
April 1980 - Oktober 1983	Lehrbeauftragter am Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie der Freien Universität Berlin
Juli 1980 - Juli 1983	Promotionsstipendiat des Cusanuswerks (Bischöfliche Studienförderung Bonn)

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen